

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA**  
**FACULTAD DE VETERINARIA**

**Programa de Posgrados**

**Efecto de la sustitución parcial de una ración totalmente mezclada por alfalfa en dos estadios fenológicos sobre la degradabilidad de nutrientes, ambiente ruminal, microbiota y producción de metano en un sistema de rumen artificial.**

**CAMILA MOREIRA**

**TESIS DE MAESTRÍA EN NUTRICIÓN DE RUMIANTES**

**URUGUAY**

**2025**



**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA**  
**FACULTAD DE VETERINARIA**

**Programa de Posgrados**

**Efecto de la sustitución parcial de una ración totalmente mezclada por alfalfa en dos estadios fenológicos sobre la degradabilidad de nutrientes, ambiente ruminal, microbiota y producción de metano en un sistema de rumen artificial.**

**CAMILA MOREIRA**

---

**Alejandro Britos DMTV, MSc, PhD**  
Director de Tesis

---

**Sofía Fernández Lic. Bioquímica, PhD**  
Co-Directora

**2025**

## **INTEGRACIÓN DEL TRIBUNAL DE**

### **DEFENSA DE TESIS**

**Yoana Dini Vilar, Ing. Agr, MSc, PhD.  
Área Sustentabilidad, CONAPROLE –  
Uruguay.**

**Gilberto Vilmar Kozloski, PhD,  
Universidade Federal de Santa María –  
Brasil.**

**Sebastián Brambillasca, DCV, MSc, PhD,  
Facultad de Veterinaria Universidad de la  
República – Uruguay.**

## ACTA DE DEFENSA DE TESIS DE MAESTRÍA

Materia: 10002 TESIS DE MAESTRIA

Orientación: Nutrición Animal en Rumiantes.

Período: OCTUBRE 2025

Fecha evaluación: 16/10/2025

Hora: 16:00

Lugar: Salón aula 05

Tribunal:

Presidente: Sebastián Brambillasca

2° Integrante: Yoana Dini

3er Integrante: Dr. Gilberto Kozloski (Brasil)

C.I.	Nombre	Concepto	Nota
4507073 - 5	Camila Moreira Gil	Muy bueno	

Nota: La calificación mínima para aprobar la defensa es Aceptable (A)

TRIBUNAL

FIRMA

S. Brambillasca

*Sebastián Brambillasca*

Yoana Dini

*Yoana Dini*

Gilberto Kozloski

*Gilberto Kozloski*



## DEDICATORIAS Y/O AGRADECIMIENTOS

A la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) y Centro Académico de Posgrados (CAP) de la Universidad de la República que hicieron posible la financiación de mis estudios de maestría y el desarrollo de esta investigación.

A mi director y co-directora de tesis, Alejandro, y Sofía, por su guía, paciencia y apoyo durante este proceso.

A mis compañeros, por compartir problemas y construir juntos soluciones.

A mi familia y amigxs, por hacer de la vida un lugar mas lindo y ser el mejor desahogo en los días de frustración. Con ustedes, todo tiene sentido.

A mi madre, Gricel, por ser un pilar fundamental de mi vida, acompañarme y brindarme su cariño incondicional.

A Moro y Celeste, mis ángeles en la tierra y en el cielo.

A mi papá, que convirtió sus luchas en mis oportunidades. Cada logro mío es, en realidad, suyo.

A todxs, mi más sincero agradecimiento.

# ÍNDICE

RESUMEN	9
SUMMARY	11
INTRODUCCIÓN	12
ANTECEDENTES ESPECÍFICOS	14
Metanogénesis y ecología microbiana ruminal	14
Mitigación de emisiones de metano en vacas lecheras: estrategias nutricionales.	15
Ración totalmente mezclada.	16
Ración parcialmente mezclada.	16
Cantidad de pastura incluida en la dieta	17
Calidad de la pastura incluida en la dieta	17
Alfalfa	18
Estadio de maduración/fenológico	19
Secuenciación y caracterización de la microbiota ruminal.	19
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	22
HIPÓTESIS	24
OBJETIVO GENERAL	25
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
MATERIALES Y MÉTODOS	26
Diseño experimental	26
Caracterización de la alfalfa	26
Dietas	28
Procedimiento de la fermentación in vitro	28
Mediciones y toma de muestras	28
Desaparición de nutrientes	30
Análisis químicos	30
Extracción de ADN	31
Secuenciación masiva de ADNr 16S y procesamiento de datos	31
Visualización de datos de la secuenciación de ADNr16S.	32
Análisis estadísticos.	32
Desaparición de nutrientes, ambiente ruminal y producción de metano.	32
Microbiota ruminal	33
RESULTADOS	34
Desaparición de nutrientes	34
Parámetros del ambiente ruminal	34



Producción de metano	35
Microbiota ruminal	35
Descripción general	35
Diversidad alfa	37
Diversidad beta	38
PERMANOVA	38
Métodos de reducción dimensional.	40
Cambios específicos en las comunidades.	41
Arqueas	42
DISCUSIÓN	43
Desaparición de nutrientes	43
Parámetros del ambiente ruminal y producción de metano.	44
Microbiota ruminal	46
Discusión general	51
CONCLUSIONES	53
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

## RESUMEN

En Uruguay, donde el 70 % de la leche se exporta, la sostenibilidad ambiental es clave para favorecer la competitividad del sector lácteo. Frente a este desafío, se promueven estrategias que reduzcan emisiones de gases de efecto invernadero, como el uso de raciones parcialmente mezcladas (RPM), que combinan pasturas con raciones totalmente mezcladas (RTM). Estas dietas disminuyen los costos, mejoran el bienestar animal y reducen el impacto ambiental. En este sentido, el estudio del ecosistema ruminal es fundamental para optimizar la productividad y mitigar las emisiones de metano. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de sustituir el 40% de una ración totalmente mezclada para vacas lecheras por alfalfa en estado vegetativo medio o botón temprano sobre la degradabilidad de nutrientes, la microbiota, el ambiente ruminal y las emisiones de metano en un sistema de rumen artificial (RuSiTec; Rumen Simulation Technique). El experimento fue llevado a cabo en un sistema *in vitro* de fermentación ruminal con 6 unidades de fermentación donde se incubaron por duplicado tres dietas formuladas para vacas lecheras de alta producción: (1) 60:40 RTM: alfalfa en estado vegetativo medio (RPM1); (2) 60:40 RTM: alfalfa en botón temprano (RPM2); (3) 100:0 RTM (control), en tres corridas de 14 días (7 días para equilibrar el sistema, y 7 días de muestreo). Los datos se analizaron utilizando modelos mixtos, con la corrida como efecto aleatorio y el tratamiento y el día de muestreo, cuando se utilizaron medidas repetidas, como efectos fijos. Se compararon las medias utilizando contrastes ortogonales preplanificados (RPMs vs RTM y RPM1 vs RPM2). La desaparición de la materia orgánica (dMO) y de la fibra detergente neutro (dFDN) en la dieta RTM fue de 52,4% y 34,3%, respectivamente, valores superiores a los observados en las dietas RPM (dMO=50,4% y dFDN=29,0%). El pH ruminal fue más alto en la dieta RPM2 (6,65) en comparación con RPM1 (6,55) y RTM (6,53), a pesar de que no se observaron diferencias en la producción total de ácidos grasos volátiles (AGVs) entre dietas. La proporción de ácido propiónico fue mayor en la dieta RTM respecto a las RPMs (28,8% vs. 26,8%). Por su parte, la dieta RPM1 presentó una mayor proporción de ácido butírico que RTM y RPM2 (9,72% vs. 9,01% y 9,05%, respectivamente). Además, la producción de metano no se afectó por la dieta. Por otra parte, la sustitución parcial de una dieta RTM por alfalfa modificó tanto la estructura como la diversidad de la comunidad microbiana ruminal. Particularmente se observó en las dietas parcialmente mezcladas una disminución en la abundancia de *Prevotella* spp. y *Succinivibro* spp., géneros productores de propionato, y un aumento en la de *Lactobacillus* spp. y *Streptococcus* spp., géneros que proliferan generalmente durante la acidosis, respecto a la dieta control. Por otro lado, la abundancia relativa de arqueas no se vio afectada por la dieta. En conclusión, la sustitución parcial de ración totalmente mezclada por alfalfa no afectó la producción de metano, aunque sí modificó positivamente el pH ruminal, especialmente con alfalfa en botón temprano. No obstante, esta estrategia disminuyó la degradabilidad de los

nutrientes y promovió cambios en la microbiota ruminal asociados a un mayor riesgo de acidosis. Por lo tanto, la implementación de estas raciones mixtas requiere una cuidadosa optimización para equilibrar sus beneficios en el ambiente ruminal manteniendo la eficiencia digestiva.

## SUMMARY

In Uruguay, where 70% of milk is exported, environmental sustainability is key to enhancing the competitiveness of the dairy sector. Faced with this challenge, strategies to reduce greenhouse gas emissions are being promoted, such as the use of partial mixed rations (PMR), which combine pasture with total mixed rations (TMR). These diets lower costs, improve animal welfare, and reduce environmental impact. In this context, the study of the ruminal ecosystem is fundamental for optimizing productivity and mitigating methane emissions. The aim of this work was to evaluate the effect of replacing 40% of a total mixed ration for dairy cows with alfalfa at mid-vegetative or early bud stage on nutrient degradability, microbiota, ruminal environment, and methane emissions in an artificial rumen system (Rusitec; Rumen Simulation Technique). The experiment was conducted in an in vitro ruminal fermentation system with 6 fermentation units, where three diets formulated for high-producing dairy cows were incubated in duplicate: (1) 60:40 TMR: mid-vegetative alfalfa (PMR1); (2) 60:40 TMR: early bud alfalfa (PMR2); (3) 100:0 TMR (control), over three 14-day runs (7 days for system equilibration and 7 sampling days). Data were analyzed using mixed models, with the run as a random effect and the treatment and sampling day, when repeated measures were used, as fixed effects. Means were compared using pre-planned orthogonal contrasts (PMRs vs. TMR and PMR1 vs. PMR2). The organic matter disappearance (OMD) and neutral detergent fiber disappearance (NDFD) in the TMR diet were 52.4% and 34.3%, respectively, values higher than those observed in the PMR diets (OMD=50.4% and NDFD=29.0%). Ruminal pH was higher in the PMR2 diet (6.65) compared to PMR1 (6.55) and TMR (6.53), although no differences were observed in total volatile fatty acid (VFA) production between diets. The proportion of propionic acid was higher in the TMR diet compared to the PMRs (28.8% vs. 26.8%). Meanwhile, the PMR1 diet showed a higher proportion of butyric acid than TMR and PMR2 (9.72% vs. 9.01% and 9.05%, respectively). Furthermore, methane production was not affected by the diet. On the other hand, the partial replacement of a TMR diet with alfalfa modified both the structure and diversity of the ruminal microbial community. Specifically, in the partial mixed rations, a decrease in the abundance of *\*Prevotella\** spp. and *\*Succinivibrio\** spp., propionate-producing genera, and an increase in *\*Lactobacillus\** spp. and *\*Streptococcus\** spp., genera that generally proliferate during acidosis, were observed compared to the control diet. In contrast, the relative abundance of archaea was not affected by the diet. In conclusion, the partial replacement of a total mixed ration with alfalfa did not affect methane production, although it positively modified the ruminal pH, especially with early bud alfalfa. However, this strategy decreased nutrient degradability and promoted changes in the ruminal microbiota associated with a higher risk of acidosis. Therefore, the implementation of these mixed rations requires careful optimization to balance their benefits on the ruminal environment while maintaining digestive efficiency.

## INTRODUCCIÓN

El cambio climático constituye una grave amenaza para el planeta, y una de sus principales causas es el aumento de la concentración de gases de efecto invernadero (GEI) de origen antropogénico en la atmósfera (*Intergovernmental Panel on Climate Change* [IPCC], 2007). Si bien algunos GEI se producen de manera natural y sus concentraciones fluctúan sin la intervención humana, ciertas actividades humanas generan cantidades adicionales de estos gases, lo que altera la composición atmosférica y contribuye al calentamiento gradual de la superficie terrestre (Mitchell, 1989; Shackleton, 2003). En el marco del Acuerdo de París, dentro de la Convención Marco de las Naciones Unidas sobre el Cambio Climático, los países se comprometieron a adoptar medidas para reducir las emisiones de GEI con el objetivo de limitar el aumento de la temperatura global a menos de 2°C en comparación con los niveles preindustriales. Los principales GEI son: vapor de agua, dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), metano (CH<sub>4</sub>), óxido nitroso (N<sub>2</sub>O), y ozono (Easterbrook, 2016). Las tres principales fuentes de CH<sub>4</sub> de origen biogénico son la agricultura arrocerá, los rumiantes, especialmente el ganado bovino, y los humedales naturales (Khalil & Shearer, 1993). Una característica destacable del CH<sub>4</sub> es que posee un potencial de calentamiento global (GWP, por sus siglas en inglés) a 100 años entre 28 y 36 veces mayor que el del dióxido de carbono (Balcombe, et al., 2018).

Los rumiantes tienen la capacidad de consumir forrajes y otros alimentos fibrosos gracias a la presencia de una comunidad microbiana en su rumen, que descompone los carbohidratos estructurales de las células vegetales antes de que sean procesados por las enzimas digestivas (McDonald et al., 1999; Reay et al., 2010). Al final de esta cadena trófica, las arqueas metanogénicas utilizan los productos finales de la degradación como sustratos para producir metano, que es expulsado principalmente a través de la eructación (Morgavi et al., 2010). La producción de metano no solo tiene efectos negativos sobre el medio ambiente, sino que también representa una disminución de la eficiencia productiva, ya que implica una pérdida de entre el 6% y el 10% de la energía ingerida con los alimentos (McDonald et al., 1999).

En 2022, las emisiones brutas nacionales de gases de efecto invernadero (GEI) en Uruguay alcanzaron las 37.514 toneladas de CO<sub>2</sub>-eq (GWP 100, AR2). El metano (CH<sub>4</sub>), producido fundamentalmente en la fermentación Entérica del ganado vacuno, fue el principal GEI emitido en el país y representó el 58% del total de los gases (Ministerio de Ambiente, 2024). Nuestro país firmó y ratificó el Protocolo de Kioto (1997, vigente hasta 2020) y luego el Acuerdo de París (2016, en vigencia), ambas instancias son acuerdos internacionales que tienen como objetivo reducir las emisiones de GEI como forma de limitar el calentamiento global sin amenazar la producción de alimentos. La Primera Contribución Determinada a nivel Nacional pretende responder a las disposiciones

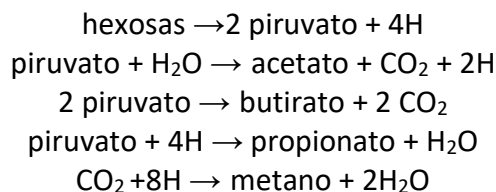
establecidas en el Acuerdo de París teniendo como uno de los objetivos la reducción de la intensidad de las emisiones de metano (emisiones de CH<sub>4</sub> por unidad de PBI) en un 57% respecto a los valores de obtenido en 1990. Para ello, es determinante evaluar las emisiones de metano generadas por la utilización de dietas comunes en nuestro país y explorar estrategias nutricionales alternativas.

## ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

### Metanogénesis y ecología microbiana ruminal

La fermentación de los componentes del alimento en el rumen es resultado de las actividades coordinadas de un gran número de microorganismos pertenecientes a los tres dominios, Eubacteria, Archaea y Eukarya (Nagaraja, 2016). De acuerdo a su distribución en el rumen las bacterias ruminales se clasifican en 5 grupos: 1) bacterias asociadas a la fase líquida, 2) bacterias asociadas débilmente a las partículas de alimentos, 3) bacterias adheridas firmemente a partículas de alimentos, 4) bacterias asociadas al epitelio ruminal y 5) bacterias adheridas a la superficie de protozoos o esporangios fúngicos (Hobson & Stewart, 1988; Miron et al., 2001). Las bacterias ruminales asociadas a las partículas de alimentos representan aproximadamente el 70% de la comunidad bacteriana total, y ejercen un rol fundamental en la digestión ruminal (Miron et al., 2001; Nagaraja, 2016) mientras que las asociadas a la fase líquida (20-30% del total), tienen escasa participación directa en la digestión de partículas insolubles de alimento (Miron et al., 2001).

Los carbohidratos de la dieta son hidrolizados a hexosas o pentosas, y éstas fermentadas para formar ATP que es utilizado por la microbiota para su mantenimiento y crecimiento, dejando como desecho ácidos grasos volátiles (AGV; principalmente acetato, propionato y butirato), principal fuente de energía para el rumiante. La mayoría de los carbohidratos dietarios son metabolizados a piruvato casi exclusivamente mediante la vía glucolítica de Embden–Meyerhof. El Acetil CoA es el compuesto intermediario en la formación de acetato y butirato a partir de piruvato, mientras que la formación de propionato ocurre principalmente mediante la vía del succinato. La conversión de hexosas a acetato o butirato genera poder reductor, utilizado en parte durante la formación de propionato, pero principalmente es convertido por las arqueas metanogénicas en metano (France & Dijkstra, 2005; Morgavi et al., 2010). La reacción puede resumirse como:



La cantidad de metano formado a partir de dióxido de carbono durante la fermentación depende de la cantidad de hidrógeno producido durante la formación de acetato y butirato. Esencialmente, cuanto mayor es la relación Acetato+Butirato/ Propionato, mayor será el volumen de gas producido y mayor será la proporción de metano en el gas (Owens & Basalan, 2016). La

concentración relativa de los ácidos es determinada por la composición de la comunidad microbiana que, a su vez, es definida en gran medida por la dieta; particularmente el tipo de carbohidrato y la velocidad de despolimerización del sustrato. Generalmente, cuanto mayor es la cantidad de concentrado incluido en la dieta mayor es la producción de propionato, aunque el acetato es el principal AGV producido (France & Dijkstra, 2005).

Además de las arqueas, otros grupos microbianos inciden en la metanogénesis. Al ser el hidrógeno ( $H_2$ ) el principal elemento utilizado en la síntesis de metano en el rumen, los microorganismos que lo producen ejercen un rol relevante en la producción de metano. Entre los microorganismos productores de  $H_2$ , se ha destacado el rol preponderante de los protozoos debido a su estrecha relación física con las arqueas lo que favorece la transferencia de  $H_2$  entre ambos grupos. En este sentido, se ha visto una interacción positiva entre el número de protozoos y las emisiones de metano (Morgavi et al., 2010). Otro grupo relevante incluye a los microorganismos fibrolíticos que constituyen el primer nivel de la cadena trófica microbiana que transforma los polisacáridos de las paredes celulares de las plantas en AGVs,  $CO_2$  y  $H_2$ . La mayoría de los miembros de este grupo produce principalmente  $H_2$  como producto final de la fermentación, que en condiciones fisiológicas es rápidamente utilizado por las arqueas. La transferencia entre especies que producen y utilizan  $H_2$  es fundamental en el funcionamiento del ecosistema ruminal ya que evita el aumento de la presión parcial de  $H_2$  hasta niveles que podrían inhibir el funcionamiento normal de las enzimas microbianas y finalmente reducir la fermentación ruminal (Wolin et al., 1997).

### **Mitigación de emisiones de metano en vacas lecheras: estrategias nutricionales.**

Numerosas investigaciones han tenido como objetivo la evaluación de estrategias que disminuyan las emisiones de metano en el ganado. Entre ellas se destacan: la selección genética de animales que producen menores emisiones de metano, la mejora de la eficiencia productiva (Reay et al., 2010) y la mejora de la calidad del alimento mediante el uso de moduladores de la fermentación (Fraga et al., 2015; Ungerfeld et al., 2005); mejorando la calidad de las pasturas (Dini et al., 2012, 2018; Hammond et al., 2011) o incorporando alimentos concentrados (principalmente almidonosos) en la dieta (Lovett et al., 2005; Muñoz et al., 2015). La reducción de las emisiones de  $CH_4$  deben ser evaluadas en asociación con las de otros GEI. En este sentido, el aumento en la proporción de granos en la dieta disminuye el  $CH_4/kg$  de leche producida, pero produce mayores cantidades de  $CO_2$  debido a las pérdidas de materia orgánica en el suelo, el uso de combustibles, fertilizantes, secado y transporte de granos (Reay et al., 2010; Waghorn & Woodward, 2006).



Los avances tanto en la nutrición, como en el manejo, genética y sanidad animal desde los comienzos de la comercialización láctea a finales del siglo XIX, permitieron incrementar la eficiencia productiva y duplicar en los últimos 50 años la producción mundial de leche (Connor, 2015). El tracto digestivo de los rumiantes ha evolucionado para la alimentación con forrajes, por tanto, las raciones se basaron en pasturas en estaciones cálidas, y heno o silo en estaciones frías. Al aumentar la producción de leche por vaca, aumentaron los requerimientos nutricionales y se hizo evidente la necesidad de suplementar las dietas con concentrados. Éstos contenían típicamente granos disponibles (por ej. maíz, avena, cebada, trigo) además de una fuente de suplemento proteica (por ej. harina de soja, harina de semilla de algodón, harina de linaza) (Schingoethe, 2017). Actualmente, muchos sistemas de producción láctea utilizan raciones totalmente mezcladas (RTMs) formuladas para cubrir los requerimientos nutricionales del ganado (Capper et al., 2009).

#### Ración totalmente mezclada.

En estos sistemas, el forraje y los concentrados son mezclados previamente y el ganado es alimentado con la mezcla (Gill, 1979). Las RTM suelen contener ensilaje o heno de forrajes, granos (maíz, avena, cebada, trigo), alimentos proteicos, minerales, vitaminas, aditivos y subproductos (Moscovici Joubran et al., 2021).

El uso de RTM presenta algunas ventajas frente a la alimentación con concentrados y forrajes por separado. Se ha visto que se minimiza la selección de ingredientes del alimento por parte del ganado y la ocurrencia de trastornos digestivos (Hernández-Urdaneta et al., 1976) lo que refleja que cada bocado se encuentra nutricionalmente más balanceado. Además, se destaca el aumento en la producción láctea y una mejora en la eficiencia de conversión de la energía metabolizable en leche (Holter et al., 1977). El aumento de la productividad por vaca reduce el número de animales necesarios para producir el mismo volumen de leche, lo que se traduce en menores costos de alimentación, disminución en el uso de recursos naturales y de la huella de carbono global de la producción láctea (Capper et al., 2009). Los sistemas productivos intensivos modernos presentan una huella de carbono por vaca de mayor magnitud que los sistemas empleados hace 60 años, lo que llevaría a pensar que son menos sustentables desde el punto de vista medioambiental. Sin embargo, la huella de carbono por kg de leche producida en los sistemas actuales se redujo a menos del 40% (Capper et al., 2009).

#### Ración parcialmente mezclada.

Una estrategia de alimentación alternativa a la RTM es la ración parcialmente mezclada (RPM), que combina el pastoreo con la RTM, siendo el forraje pastoreado por las vacas y no un constituyente físico de la ración (Bargo et al.,

2002). Reemplazar una proporción de la RTM por pastura mejora la rentabilidad del sistema dado que las pasturas tienen un menor costo de producción que las RTM (Lee & Roberts, 2015), y, por tanto, las RPMs permiten conservar el costo relativamente bajo de los sistemas basados en pastoreo a la vez que capitalizan los beneficios de las RTMs (Wales et al., 2013).

En los últimos años ha crecido el interés de los consumidores por productos lácteos provenientes de vacas alimentadas a pastoreo. Esta tendencia se debe a percepciones favorables de los consumidores relacionadas a la salud, cuidado del ambiente y bienestar animal, y por lo mismo, presentan un precio diferencial en el mercado (Mee & Boyle, 2020; Moscovici Joubran et al., 2021). En este sentido, es sabido que la composición de la leche bovina es afectada por numerosos factores, entre ellos la dieta. Específicamente se ha visto que las dietas basadas en pastura modifican la cantidad y composición de la grasa láctea (Moscovici Joubran et al., 2021). La inclusión de forraje fresco en la dieta le otorga a la leche producida algunas características deseables ya que disminuye la concentración de ácidos grasos saturados, y aumenta la concentración de ácido linoleico conjugado y de otros ácidos grasos benéficos, logrando un perfil nutricionalmente más saludable (Mendoza et al., 2016; Moscovici Joubran et al., 2021; Vibart et al., 2008).

#### *Cantidad de pastura incluida en la dieta*

La proporción de pastura fresca incluida en la dieta influye en el consumo de materia seca (CMS) y, por tanto, en la producción de leche. En esta línea, Mendoza et al. (2016) observaron que una inclusión de 11% de forraje fresco en la dieta lograba mantener tanto el consumo como la producción láctea (34,9 vs. 34,4 kg/d) de vacas que sólo consumieron RTM. Sin embargo, al aumentar la inclusión de pastura al 30%, Bargo et al. (2002) evidenciaron una reducción significativa de ambos parámetros (CMS: 25,2 vs. 26,7 kg/día y producción láctea: 32,0 vs. 38,1 kg/d). Vibart et al. (2008) compararon una RTM y tres RPMs con niveles crecientes de inclusión de pastura en dos experimentos (en otoño y primavera), y observaron que el aumento de la proporción de pastura en la dieta redujo el CMS. En cuanto a la producción láctea, los experimentos mostraron resultados diferentes; en el que fue llevado a cabo en otoño la inclusión de un 41% de pastura no presentó diferencias (34,1 vs. 32,9 kg/día) mientras que en el llevado a cabo en primavera a partir de una inclusión del 21% se observó una disminución significativa (36,6 vs. 31,9 kg/día). La pastura utilizada fue raigrás anual y su composición química varió entre los experimentos, presentando un menor contenido de MS (16,4 vs. 24,8%) y mayor de PB (23,7 vs. 13,9%) en la pastura de otoño.

#### *Calidad de la pastura incluida en la dieta*

La calidad de las pasturas incluidas en la dieta puede ser utilizada como una estrategia de mitigación de las emisiones de gases de efecto invernadero en

sistemas productivos a pastoreo. Los animales que consumen pasturas de alta calidad presentan menores emisiones de metano, tanto por unidad de materia seca (MS) ingerida como por porcentaje de energía bruta ingerida, que aquellos que consumen pasturas de baja calidad (Dini et al., 2018). Asimismo, la inclusión de aproximadamente 40% de pastura de alta calidad (de 38,2% en 6 h de pastoreo continuo y de 45,7% en 6 h de pastoreo dividido en 2 períodos de 3 horas) a dietas RTM además de mantener el consumo de materia seca y la producción láctea, reduce las emisiones de metano obtenidas con alimentación exclusivamente con RTM (656 vs. 590 y 503 g CH<sub>4</sub>/d y 41,7 vs. 37,4 y 31,2 g CH<sub>4</sub>/kg de MS ingerida; RTM vs RPM (6 horas de pastoreo continuo y dividido en 2 períodos) (Dall-Orsoletta et al., 2016). Las mayores emisiones de metano en las vacas alimentadas con RTM en comparación con las alimentadas con RTM parcial se correlacionó con el mayor contenido de FDN y relación ADF:NDF de la dieta TMR. En esta línea, algunos autores sugieren el uso de leguminosas en lugar de gramíneas como estrategia de mitigación de las emisiones de metano en el ganado (Waghorn et al., 2002).

### *Alfalfa*

La alfalfa es una leguminosa que se destaca por su capacidad para producir grandes cantidades de forraje de alta calidad, su rápida recuperación tras el corte, longevidad y tolerancia al estrés ambiental. Además, fija más cantidad de N<sub>2</sub> atmosférico que otras leguminosas gracias a su relación simbiosis con *Rhizobium spp.* que otras leguminosas lo que permite reducir el uso de fertilizantes (Radović et al., 2009). Así mismo, es considerada uno de los alimentos más nutritivos para la alimentación de ganado principalmente debido a: su rápido pasaje a través de tracto gastrointestinal, el aporte de proteína soluble para la síntesis de proteína microbiana y vitaminas del complejo B por los microorganismos ruminales, la estimulación de la digestión de celulosa y su contenido en vitaminas A, E y K. Adicionalmente, la alfalfa posee cantidades relativamente elevadas de componentes celulares solubles y un bajo contenido de paredes celulares en comparación con otros forrajes (Tomić et al., 2001).

Las plantas producen compuestos que les confieren competitividad en su entorno y funcionan como antimicrobianos, denominados metabolitos secundarios (Teoh, 2015). Un ejemplo de ellos son las saponinas, producidas, entre otras, por la alfalfa, que modulan la fermentación ruminal debido a su efecto antimicrobiano selectivo frente a algunos protozoos y bacterias ruminales. Esta modulación da lugar a una disminución en la proporción de acetato:propionato y dado que existe una simbiosis entre los protozoos y las metanógenas ruminales, la inhibición de protozoos constituye una buena alternativa para reducir las emisiones de metano sin provocar efectos adversos en el consumo de nutrientes ni en su digestibilidad (Goel & Makkar, 2012; Malik & Singhal, 2009; Rodrigues, 2016).

### *Estadio de maduración/fenológico*

El momento en que se realiza la cosecha es la herramienta más poderosa que tiene el productor para influir en el rendimiento y la calidad del forraje, maximizando el potencial de rentabilidad; incluso superando la importancia de la selección del cultivar, la fertilización y otros elementos de manejo (Orloff & Putnam, 2006). El rendimiento y la calidad de la alfalfa se relacionan de forma inversa (Brink et al., 2010) y están condicionados por diversos factores, tales como la etapa de desarrollo fenológico, las condiciones agroecológicas y la variedad, entre otros (Katanski et al., 2020). La cosecha de la alfalfa en estadios tempranos de maduración, por ejemplo, previo a estadio de botón o botón temprano, aumenta la calidad del forraje, pero disminuye su rendimiento. Se ha observado una disminución en la calidad de la alfalfa cosechada en estadio tardío de floración en comparación con la cosechada en etapa de botón temprano (Brink et al., 2010).

La etapa de desarrollo del cultivo es el factor determinante en la variación de la calidad nutricional de la alfalfa; a medida que progresa el estadio fenológico, decrece la calidad del forraje de alfalfa. Esto se asocia a cambios en la composición química del forraje, caracterizados principalmente por una reducción en el contenido de proteína bruta y en la digestibilidad *in vitro* verdadera, junto a un incremento de los componentes fibrosos en el tallo. Además, la pérdida de proteína bruta y digestibilidad se manifiesta de forma más pronunciada en el tallo que en las hojas a medida que la planta madura (Kalu & Fick, 1981; Marković et al., 2008; Radović et al., 2009). En este sentido, Niwinska et al. (2005) observaron que la alfalfa cosechada en estadio de botón presenta un mayor contenido de materia orgánica (MO), carbohidratos no fibrosos y contenido celular, pero menor contenido de fibra cruda, fibra detergente neutra (FDN), fibra detergente ácido (FDA), celulosa, lignina ácido detergente (LAD) en comparación con alfalfa cosechada en estado de prefloración. Además, la relación entre los carbohidratos no estructurales (CNE) y la FDN en la dieta incide directamente en la producción de metano: una mayor proporción CNE/FDN reduce las emisiones (Waghorn et al. 2002).

### **Secuenciación y caracterización de la microbiota ruminal.**

El microbioma ruminal es el factor distintivo de todos los rumiantes, y profundizar su comprensión permitirá optimizar la producción de alimentos (McCann et al., 2014). Muchos de los microorganismos colonizan y se desarrollan en el rumen en armonía con el huésped, formando parte de la microbiota ruminal “natural” o autóctona. A su vez, se encuentran microorganismos que ingresan al rumen mayoritariamente con los alimentos, agua, y otras fuentes ambientales, son denominados alóctonos y no se establecen en el rumen, son transitorios (Nagaraja, 2016). La composición de la población microbiana ruminal está determinada por numerosos factores, entre ellos la dieta, la localización

geográfica e incluso la especie animal. En general, la dieta es el principal determinante del tipo y número de los microorganismos ruminales predominantes y de sus funciones en el animal adulto. En este sentido, se han encontrado observaciones similares en animales alimentados con dietas similares en todas partes del mundo (Hobson & Stewart, 1988).

Los parámetros evaluados tradicionalmente para determinar la habilidad de una dieta de cubrir las necesidades de rumiantes como el consumo de alimento, parámetros de fermentación, tasa de pasaje, digestibilidad de la dieta y el metabolismo del nitrógeno están fuertemente relacionadas con la comunidad microbiana ruminal. La evolución de las técnicas de secuenciación ha permitido una caracterización más precisa de las poblaciones microbianas, sentando las bases para nuevos avances en la producción (McCann et al., 2014).

Anteriormente, el conocimiento clásico de la microbiología ruminal se basaba en el cultivo en condiciones de anaerobiosis. Hoy en día, el uso de técnicas de secuenciación de alto rendimiento o secuenciación masiva permiten la descripción y caracterización de las comunidades microbianas con mayor precisión (McCann et al., 2014). Los métodos de segunda generación de secuenciación o *Next Generation Sequencing* son ampliamente usados siendo Solexa e Ion Torrent comercializadas por Illumina y Thermo Fisher, respectivamente, dos de las plataformas más usadas. Estos métodos requieren de un paso previo de amplificación por PCR. Existen también, secuenciadores de tercera generación, que presentan la ventaja de que la secuenciación se realiza directamente sin la necesidad de la amplificación por PCR y que se obtienen secuencias de mayor longitud. Entre los métodos de tercera generación se encuentra Sequel System y MinION de PacBio y Oxford Nanopore, respectivamente (del Campo-Moreno et al., 2018). Sin embargo, los secuenciadores de segunda generación son los más empleados en el estudio de microbiomas, destacándose por su costo moderado en comparación con otras metodologías (Fricker et al., 2019).

El gen ARN ribosomal 16S, se ha utilizado como un marcador taxonómico de identificación. La secuenciación del gen ARNr 16S comienza con la extracción de ADN de una muestra, seguida de su amplificación mediante la unión selectiva de *primers* universales a secuencias altamente conservadas de la región hipervariable del gen ARNr 16S (como V3-V5). Posteriormente, se secuencian los amplicones de dicha región, proporcionando información filogenética suficiente que permite la clasificación taxonómica (Gotschlich et al., 2019). Posteriormente, a las secuencias se le asignan grupos taxonómicos utilizando bases de datos disponibles y se analizan los resultados con herramientas bioinformáticas. En el análisis de la microbiota basado en la taxonomía del gen del ARNr 16S se cuantifica la abundancia relativa de cada filo, familia o género (del Campo-Moreno et al., 2018).

Otra estrategia utilizada para caracterizar la microbiota es la metagenómica, que se basa en la secuenciación masiva de ADN o ARN sin necesidad de amplificación previa. Esta metodología contempla todo el genoma de los microorganismos en lugar de enfocarse únicamente a los fragmentos del gen ARNr 16S y por tanto permite un análisis taxonómico y funcional más completo de los genomas microbianos (virales, bacterianos y eucariotas) (del Campo-Moreno et al., 2018; Fricker et al., 2019).



## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En los últimos años, las presiones sobre varios eslabones de la cadena alimentaria se han intensificado debido al aumento de la globalización, la reducción de los precios de los *commodities*, las negociaciones comerciales mundiales, el aumento de las preocupaciones por el bienestar animal, la necesidad de trazabilidad y la legislación medioambiental (Grunert et al., 2004). En Uruguay, el 70% de la leche producida se exporta, por lo que el futuro de la industria láctea depende de su competitividad, determinada entre otros factores por el costo de producción, la mano de obra, el impacto ambiental y la capacidad de desarrollar productos diferenciados (Fariña & Chilbroste, 2019; Grunert et al., 2004). La alimentación del ganado influye directamente en la producción de CH<sub>4</sub>, ya que la fermentación ruminal de carbohidratos estructurales genera hidrógeno (H<sub>2</sub>), utilizado por las arqueas metanogénicas para sintetizar CH<sub>4</sub> (France & Dijkstra, 2005; Morgavi et al., 2010; Owens & Basalan, 2016). La composición de la dieta moldea la microbiota ruminal (de Menezes et al., 2011) y, por ende, la producción de metano (Morgavi et al., 2010). El estudio de la ecología microbiana del rumen y sus dinámicas es esencial para el diseño de sistemas de alimentación orientados a maximizar la eficiencia de producción, mejorar la salud animal y reducir las emisiones de metano (de Menezes et al., 2011).

Una estrategia que aborda varios de los puntos expuestos es la inclusión de pasturas en sistemas de alimentación para vacas lecheras basados en RTM, ya que disminuye los costos de alimentación, mejora el bienestar animal, reduce el impacto ambiental y agrega valor a los productos (Dall-Orsoletta et al., 2016; Mee & Boyle, 2020; Moscovici Joubran et al., 2021). La proporción de la pastura incluida en la dieta influye en la producción láctea; se han encontrado disminuciones en la producción láctea con inclusiones de del 21% (Vibart et al., 2008) y 30% (Bargo et al., 2002), mientras que inclusiones del 41% permitieron mantener la producción láctea (Vibart et al., 2008). Así mismo, las estrategias nutricionales orientadas a mitigar las emisiones de metano deberían incluir el uso de pasturas de buena calidad (Dini et al., 2018) priorizando la elección de leguminosas en lugar de gramíneas (Waghorn et al., 2002) y de pasturas que contengan saponinas como la alfalfa, u otros metabolitos secundarios capaces de reducir las emisiones de metano (Malik & Singhal, 2009).

Si bien hay disponible una amplia bibliografía sobre la utilización de dietas mixtas o RPM, fundamentalmente comparando niveles de inclusión de la pastura en la dieta; pocos trabajos han utilizado la alfalfa como la pastura incluida y menos aún comparado entre estadios de crecimiento. Considerando que varios estudios han demostrado que la ingestión de pasturas de alta calidad reduce las emisiones de metano en comparación con pasturas de menor calidad (Waghorn et al., 2002; Dini et al., 2018), que a medida que avanza el estadio fenológico de la alfalfa, su valor nutritivo disminuye (Kalu & Fick, 1981) y que la alimentación de vacas lecheras con dietas mixtas ha logrado reducir las emisiones de metano

frente a aquellas alimentadas exclusivamente con ración total mezclada (RTM) (Dall-Orsoletta et al., 2016) resulta imprescindible investigar de forma integrada cómo la calidad de la pastura incluida en una dieta mixta influye sobre los parámetros del ambiente ruminal, la composición de la comunidad microbiana y las emisiones de metano. Estos aspectos son fundamentales para diseñar estrategias de mitigación que, sin comprometer la productividad, logren una alimentación más eficiente y sostenible.



## HIPÓTESIS

La sustitución del 40% de una ración totalmente mezclada (RTM) por alfalfa (*Medicago sativa*) en estadio de botón temprano mantendrá una alta degradabilidad ruminal de nutrientes y producción de ácidos grasos volátiles (AGV), sin incrementar las emisiones de metano ( $\text{CH}_4$ ) en comparación con una dieta basada exclusivamente en RTM. Además, se espera que la inclusión de alfalfa en estadio vegetativo medio no solo mantenga estos beneficios, sino que mejore aún más la eficiencia fermentativa, reduciendo las emisiones de  $\text{CH}_4$  y optimizando la producción de AGV en comparación con la dieta RTM y la alfalfa en estadio de botón temprano, debido a su mayor contenido de proteína soluble, carbohidratos no fibrosos y metabolitos secundarios (como saponinas) que modulan favorablemente la microbiota ruminal.

## **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el efecto de la sustitución parcial de una ración totalmente mezclada para vacas lecheras por alfalfa sobre la degradabilidad de nutrientes, la microbiota y el ambiente ruminal y las emisiones de metano en un sistema de rumen artificial.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1) Determinar el efecto de la sustitución del 40% de una ración totalmente mezclada para vacas lecheras por alfalfa sobre la degradabilidad de nutrientes, la microbiota y ambiente ruminal y las emisiones de metano en un sistema de rumen artificial.
- 2) Caracterizar el efecto de la etapa fenológica de la alfalfa (estadio vegetativo medio o botón temprano) incluida en dietas parcialmente mezcladas para vacas lecheras sobre la degradabilidad de nutrientes, la microbiota y ambiente ruminal y las emisiones de metano en un sistema de rumen artificial.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento fue llevado a cabo en un sistema de fermentación ruminal *in vitro* (RuSiTec; Rumen Simulation Technique) del laboratorio de Fermentaciones *in vitro* de la Unidad Académica de Nutrición Animal del Departamento de Producción Animal, en el Campo Experimental N°2 de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de la República (UdelaR), San José, Uruguay. Los análisis de composición química de los alimentos se realizaron en el laboratorio de Análisis Químicos de la misma Unidad Académica. El metano fue determinado en laboratorio de Ecología Microbiana Medioambiental de la Facultad de Química de UdelaR. Las extracciones de ADN para el análisis de la comunidad bacteriana se realizaron en el laboratorio de Salud Animal (Plataforma de Salud Animal) del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIA) - La Estanzuela, Colonia, Uruguay. El ADN fue enviado al Centro de Genómica de la Universidad de Minnesota (EEUU), donde fue realizada la secuenciación. El manejo de los animales donadores de líquido ruminal se ajustó a la Ordenanza sobre el uso de animales de experimentación, docencia e investigación universitaria de la UdelaR (protocolo CEUAFVET 1714).

### Diseño experimental

La fermentación ruminal *in vitro* se realizó en un equipo RuSiTec (Czerkawski & Breckenridge, 1977) provisto de 6 fermentadores. El experimento se realizó de acuerdo a un diseño de bloques completamente aleatorizados, con 3 períodos experimentales (bloques) de 14 días cada uno, 7 días para equilibrar el sistema y 7 de mediciones y toma de muestras. Los tratamientos consistieron en 3 dietas para vacas lecheras de alta producción: (1) Dieta control (RTM), (2) 60% RTM + 40% alfalfa en estadio vegetativo medio (RPM1) y (3) 60% RTM + 40% alfalfa en estadio de botón temprano (RPM2), que fueron incubadas por duplicado en cada período experimental.

### Caracterización de la alfalfa

Las muestras de alfalfa se obtuvieron en dos instancias, octubre y diciembre de 2020, de una parcela ubicada en el campo Experimental N°2 Libertad de la Facultad de Veterinaria, UdelaR. La disponibilidad se midió cortando con tijeras al nivel del suelo 5 cuadrantes (0,1 m<sup>2</sup>) de cada forraje. Las muestras para evaluar los cambios de la composición química del forraje se cortaron a 3 cm del suelo, en 5 lugares distintos y aleatorios de la parcela.

Las alfalfas cosechadas fueron clasificadas utilizando una escala para tallos individuales propuesta por Kalu & Fick (1981) con estadios de 0 a 9 (Cuadro I). El estadio medio por peso (*Mean stage by weight* - MSW) se reporta como el promedio ponderado del peso de tallos presente en cada estadio y se calcula como la sumatoria de (S\*D) /W; donde S es el estadio de madurez, D es el peso

seco de los tallos en el estadio S y W es el peso seco de los tallos en todos los estadios presentes. El MSW de las alfalfas fue  $0.94 \pm 0.28$  y  $2.85 \pm 0.85$ , definiendo a la alfalfa cosechada en el estadio más temprano en estadio de vegetativo medio y la más tardía en botón temprano.

Se determinó la disponibilidad cortando con tijeras al nivel del suelo 5 cuadrantes ( $0,1 \text{ m}^2$ ) del forraje en cada estadio. Las muestras para evaluar los cambios de la composición química del forraje se cortaron a 3 cm del suelo, en 5 lugares distintos y aleatorios de la parcela.

Cuadro I. Estado fenológico para tallos individuales de alfalfa según el desarrollo morfológico (Adaptado de Kalu & Fick (1981)).

Estadio de madurez	Nombre de estadio	Definición del estadio
0	Vegetativo temprano	Largo del tallo $\leq 15$ cm; sin botones, flores o vainas.
1	Vegetativo medio	Largo del tallo 16-30 cm; sin botones, flores o vainas.
2	Vegetativo tardío	Largo del tallo $\geq 31$ cm; sin botones, flores o vainas.
3	Botón temprano	1 o 2 nudos con botones florales; sin flores ni vainas.
4	Botón tardío	> 3 nudos con botones florales; sin flores ni vainas.
5	Floración temprana	1 nudo con una flor abierta; sin vainas.
6	Floración tardía	> 2 nudos con una flor abierta; sin vainas.
7	Fructificación temprana	1 - 3 nudos con vainas verdes.
8	Fructificación tardía	> 4 nudos vainas verdes.
9	Semillas maduras	Nudos con vainas marrones.

En el Cuadro II se presenta la disponibilidad de forraje, la composición química y la digestibilidad *in vitro* de las alfalfas utilizadas en la dieta.

Cuadro II. Disponibilidad de forraje, composición química y digestibilidad *in vitro* de las alfalfas.

	Estadio de la alfalfa	
	Vegetativo medio	Botón temprano
<i>Disponibilidad de forraje</i>		
Forraje disponible (kg MS/ha)	$2150 \pm 4,35$	$2430 \pm 3,95$
<i>Composición química</i>		
MS (%)	$19,16 \pm 0,71$	$31,81 \pm 0,14$
MO (%MS)	$89,57 \pm 0,03$	$90,17 \pm 0,01$
FDN (%MS)	$28,84 \pm 0,10$	$34,40 \pm 0,16$
FDA (%MS)	$25,29 \pm 0,98$	$29,81 \pm 1,36$
PB(%MS)	$27,90 \pm 0,34$	$20,84 \pm 0,58$
<i>Fraccionamiento proteico (% de PB)</i>		
A	20,33	18,60
B	73,06	76,09
C	6,61	5,31
Almidón (% MS)	$1,42 \pm 0,04$	$1,41 \pm 0,03$
EE (%MS)	$1,72 \pm 0,04$	$1,57 \pm 0,03$
<i>Digestibilidad in vitro</i>		
DIVMS (%)	$77.14 \pm 0.98$	$75,11 \pm 3,00$

MS= materia seca; MO= materia orgánica; FDN= fibra detergente neutro; FDA= fibra detergente ácido; PB= proteína bruta; EE= extracto etéreo; DIVMS= digestibilidad in vitro de la materia seca. Los datos presentados son la media de 2 réplicas y su desvío estándar.

## Dietas

Las dietas fueron formuladas para cubrir los requerimientos de vacas lecheras de 600 kg produciendo 35 litros/día según NRC (2001). La RTM fue la misma para todos los tratamientos. En las RPMs la alfalfa sustituyó a la RTM en cantidades en base a materia seca (MS). En el Cuadro III se muestra la composición química, digestibilidad *in vitro* y proporción de ingredientes de RTM y en el Cuadro IV la composición química y digestibilidad de las dietas formuladas. Las alfalfas y el ensilaje que componían las dietas fueron liofilizadas (SP Scientific Benchttop Pro, Warminster, PA) y molidas utilizando una criba de 2 mm.

Cuadro III. Composición química, digestibilidad *in vitro* y proporción de ingredientes de RTM.

	Ensilaje de maíz	Maíz (grano)	Cascarilla de soja	Harina de soja	Urea
<i>Composición química</i>					
MS (%)	24,93±0,3	88,71±0,23	90,23±0,23	89,30±0,12	
MO(%MS)	94,04±0,13	98,42±0,001	95,61±0,03	93,53±0,01	
FDN(%MS)	49,72±1,17	11,02±0,42	63,82±0,09	12,71±0,22	
FDA(%MS)	22,02±0,67	4,02±0,16	48,33±0,18	9,97±0,42	
PB(%MS)	10,11±0,16	8,04±0,08	9,69±0,05	47,17±0,39	
<i>Fraccionamiento proteico (% de PB)</i>					
A	56,22	43,70	13,29	8,85	
B	38,16	53,90	76,90	89,90	
C	5,63	2,40	9,81	1,25	
Almidón (%MS)	3,86±0,72	64,17±1,78	0,16±0,04	2,11±0,09	
EE(%MS)	2,73±0,32	5,91±1,03	1,77±0,02	1,92±0,07	
<i>Digestibilidad in vitro</i>					
DIVMS (%)	52,19±0,84	92,09±0,39	69,98±6,71	95,83±0,51	
<i>Porcentaje de inclusión en la RTM</i>					
	38,32	17,84	28,31	14,86	0,68

MS= materia seca; MO= materia orgánica; FDN= fibra detergente neutro; FDA= fibra detergente ácido; PB= proteína bruta; EE= extracto etéreo; DIVMS= digestibilidad *in vitro* de la materia seca. Los datos presentados son la media de 2 réplicas y su desvío estándar.

**Cuadro IV. Composición química y digestibilidad de las dietas.**

	RTM	RPM1	RPM2
<i>Composición química</i>			
MS (%)	64,19± 0,38	46,17± 0,15	51,23± 0,79
MO (%MS)	95,12±0,04	93,35±0,26	93,62±0,06
FDN (%MS)	40,40±0,33	35,89±0,64	39,55±0,22
FDA (%MS)	26,62±1,18	26,77±0,47	28,32±0,79
PB (%MS)	16,47±0,18	20,58±0,10	20,11±0,57
<i>Fraccionamiento proteico (% de PB)</i>			
A	22,44	12,59	16,32
B	75,09	82,82	78,82
C	2,47	4,59	4,86
Almidón (%MS)	17,25±1,25	11,51±2,94	9,22±0,80
EE (%MS)	2,41±0,07	2,19±0,20	2,67±0,23
<i>Digestibilidad in vitro</i>			
DIVMS (%)	87,01±0,60	80,89±5,20	84,15±1,47

RTM= Ración totalmente mezclada; RPM1=Ración parcialmente mezclada 1; RPM2= Ración parcialmente mezclada 2; MS= Materia Seca; MO= Materia Orgánica; FDN= Fibra detergente neutro; FDA= Fibra detergente ácido; PB= Proteína bruta; EE= Extracto etéreo; DIVMS= Digestibilidad in vitro de la materia seca. Los datos presentados son la media de 2 réplicas y su desvío estándar.

## Procedimiento de la fermentación *in vitro*

La fermentación *in vitro* se llevó a cabo en un sistema RuSiTec (Czerkowski & Breckenridge, 1977) con 6 unidades de fermentación de 900 mL de capacidad, dentro de un baño María a 39°C. El primer día del experimento a cada unidad de fermentación se le adicionó 600 mL de líquido ruminal y saliva artificial (McDougall, 1948) hasta completar y se colocaron dentro 2 bolsas porosas de nylon (R510, ANKOM Technology Corp., Macedon NY, EEUU), una conteniendo 10 g de contenido ruminal sólido y otra con 10 g (MS) de cada dieta. Las dietas fueron molidas utilizando una criba de 2 mm. El líquido y contenido ruminal sólido de 2 vacas canuladas (1 Holando y 1 Jersey) alimentadas con heno de mezcla de gramíneas y leguminosas (%MS 64,97 ± 0,74; %MO 91,92 ± 0,02; %FDN 62,5 ± 1,18; %FDA 38,62 ± 0,21; %PB 7,99 ± 0,27) *ad libitum* y 1 kg MS/día de maíz molido (el mismo que se utilizó para las dietas). El sistema se infundió continuamente con saliva artificial a una tasa de 3,0%/h. Luego de las primeras 24 horas de incubación, la bolsa con contenido sólido ruminal se cambió por una bolsa de nylon que contenía la dieta, y al día siguiente se reemplazó la bolsa con la dieta que se incubó desde el primer día por una nueva. De esta manera, cada día del período experimental se sustituyó una bolsa con 48 horas de incubación por una con dieta y cada unidad de fermentación siempre contuvo dos bolsas de nylon durante el experimento.

## Mediciones y toma de muestras

Durante los días 9 al 13, las bolsas incubadas se enjuagaron con saliva artificial y se conservaron a -20°C para posteriormente determinar la desaparición de nutrientes. En el mismo momento que se cambiaron las bolsas de nylon, se midió el pH directamente en cada unidad de fermentación con un pHmetro digital

(Oakton®, eChem Instruments Pte. Ltd., Singapore) y se tomaron alícuotas de líquido ruminal para la determinación de ácidos grasos volátiles (AGV) y N-NH<sub>3</sub>. Se mezcló 1 mL de líquido ruminal con 1 mL de ácido perclórico (0.1 M) y 1 mL de líquido ruminal con 0.02 mL de ácido sulfúrico (50% v/v) para AGV y N-NH<sub>3</sub> respectivamente, y se almacenaron a -20°C para su posterior análisis. Así mismo, diariamente se midió el volumen de gas producido recogido en bolsas herméticas por desplazamiento de agua y se tomó una alícuota de 10 mL para determinar el contenido de metano.

Los días 8 y 14 del período experimental se tomaron alícuotas de 10 mL de líquido ruminal y las bolsas porosas que fueron retiradas de cada fermentador y se conservaron a -20°C para el análisis del microbioma ruminal.

## **Desaparición de nutrientes**

Se determinó del día 9 al 13 la desaparición aparente de materia seca (dMS), materia orgánica (dMO), proteína bruta (dPB), fibra detergente neutro (dFDN), fibra detergente ácido (dFDA) y nitrógeno insoluble en detergente neutro (dNIDN).

Para determinar la dMS, cada bolsa fue secada a 60°C por 48 horas, y la desaparición se determinó de la siguiente manera:  $dMS = ([MS \text{ incubada (g)} - MS \text{ luego de la incubación (g)}]) / MS \text{ incubada}$ . Posteriormente, el contenido de las bolsas se molió a 1 mm y se conformaron pooles por unidad de fermentación y período de incubación ponderados por la MS residual de cada día de medición. Los pooles fueron analizados para ceniza, PB, FDN, FDA, y NDIN, y estos resultados fueron utilizados para calcular su desaparición igual que para la dMS (g).

## **Análisis químicos**

Para los análisis químicos las muestras fueron molidas con una criba de 1mm. Se determinó la MS a 105°C hasta peso constante de acuerdo a la Association of Official Analytical Chemists (A.O.A.C., 1990, método ID 934.01). Las cenizas se determinaron por combustión a 600°C durante 2h (A.O.A.C., 1990, método ID 942.05) y el porcentaje de materia orgánica (%MO) se calculó de la siguiente manera:  $\%MO = 100 - \%Cenizas$ . El nitrógeno total (N total) se analizó mediante el método de Kjeldahl (A.O.A.C., 1990, método 984.13). El valor de proteína bruta (PB) se obtuvo multiplicando el valor del N total x 6.25. Para la determinación de fibra detergente neutra (FDN) se utilizó amilasa termoestable y sulfito de sodio, y la FDN y fibra detergente ácido (FDA) fueron analizadas según Robertson & Van Soest (1981) utilizando un analizador de fibra ANKOM220 (ANKOM Technology Corp., Macedon, NY, USA). Los resultados de FDN y FDA se expresaron descontando la ceniza residual y se corrigieron por blancos (aFDNom y FDAom) de acuerdo a Mertens (2003). El contenido de Nitrógeno Insoluble en Detergente Neutro (NIDN), Nitrógeno Insoluble en Detergente Ácido



(NIDA) y Nitrógeno no proteico (NNP) fue determinado de acuerdo a Licitra et al. (1996). La proteína insoluble en detergente ácido (PIDA) e insoluble en detergente neutro (PIDN) se calculó de la siguiente manera  $NIDAx6.25$  y  $NIDNx6.25$ , respectivamente. El NNP se obtuvo mediante la filtración de la proteína verdadera precipitada con ácido tricloroacético (ácido tricloroacético al 10% p/v en agua) y se determinó como la diferencia entre el nitrógeno total y el nitrógeno retenido en el filtro. Las fracciones proteicas se calcularon de la siguiente manera: fracción A se calculó como  $NNPx6.25$ , la fracción C se definió como PIDA y la Fracción B como  $PB-(NNPx6.25)-PIDA$ . Las fracciones proteicas se expresaron como porcentaje del contenido total de PB (Pichard & Van Soest, 1977). El extracto etéreo se analizó extrayendo la grasa con éter de petróleo durante 4 h usando un extractor de grasa Goldfish (Labconco Corp., Kansas City, MO, EE. UU.) de acuerdo a Nielsen (2003). El contenido de almidón se determinó por hidrólisis enzimática usando kits comerciales (K-TATA-100A, Megazyme International Ireland, Bray, Co. Wicklow, Irlanda).

La concentración de  $N-NH_3$  en el líquido ruminal fue analizada por espectrofotometría según Weatherburn (1967) utilizando un espectrofotómetro (UNICO® 1201, United Products & Instruments, NJ, USA). La concentración de AGV (acetato, propionato y butirato) fue determinada según Adams et al. (1984) por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC, Dionex Ultimate® 3000, Waltham, MA, USA) a 210 nm usando una columna de 300 x 7,8 mm (Acclaim, Rezex ROA-Organic Acid H+ (8%), Phenomenex, USA). Se calculó la concentración total de AGV en mM como la suma de acetato, propionato y butirato, y se determinó la proporción de cada ácido en base al total. Para la determinación de metano se utilizó un cromatógrafo de gases (GC-2014, Shimadzu Scientific) equipado con un detector de conductividad térmica (TCD) y una columna molecular sieve (MS - 13x 80-100 mesh).

## **Extracción de ADN**

Las muestras de líquido ruminal y las bolsas con el alimento degradado se descongelaron a temperatura ambiente. La extracción de ADN microbiano total se realizó con el kit ZR Fecal DNA MiniPrep (ZYMO Research, USA) siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante. La agitación se realizó con FastPrep-24 a 6 m/s durante 40s y el ADN extraído se guardó a  $-20^{\circ}C$ .

## **Secuenciación masiva de ADNr 16S y procesamiento de datos**

El análisis de la comunidad microbiana del líquido ruminal y contenido sólido se realizó mediante la secuenciación masiva pareada de la región V4 (515F/806R) del gen ADNr 16S. La preparación de la biblioteca y secuenciación fue realizada en el Centro de Genómica de la Universidad de Minnesota, en una plataforma Illumina MiSeq para generar lecturas pareadas de 300 bases de longitud en cada dirección. Los datos generados se procesaron con el paquete dada2 de R (Callahan et al., 2016a) siguiendo el pipeline presentado en el repositorio de



GitHub del paquete (<https://benjjnn.g.gubub.io/dada2/tutorial.html>) y en (Callahan et al., 2016b)

En resumen, las lecturas se ajustaron y filtraron utilizando los parámetros por defecto con `truncLen=c (250, 150)` y `trimLeft= 10`. Se definieron las Amplicon Sequence Variants (ASV) y luego de eliminar las quimeras (`removeBimeraDenovo,method = "consensus"`), se asignó la taxonomía con la base de datos de Silva (versión 138). Se eliminaron las ASV con menos de 10 lecturas en total y, cuando el análisis lo requería, los conteos se normalizaron mediante el cálculo de abundancias relativas. Se utilizó DECIPHER para realizar alineaciones múltiples (Wright, 2015) y el paquete phangorn (Schliep, 2011) para construir un árbol filogenético con los parámetros recomendados por Callahan et al., 2016a.

### **Visualización de datos de la secuenciación de ADN<sub>r</sub>16S.**

Se utilizó el paquete de R phyloseq (McMurdie & Holmes, 2013) para visualizar y analizar los datos de secuenciación. Con este paquete se construyeron los gráficos de barra y Non-metric multidimensional scaling (NMDS) a partir de la matriz de distancias construidas con el método Bray-Curtis (abundancia). También se calcularon matrices de distancias utilizando los métodos Jaccard (presencia/ausencia), UniFrac (relaciones filogenéticas) y Weighted-UniFrac (relaciones filogenéticas ponderadas por abundancia) para construir gráficos de NMDS. Se estimaron parámetros de diversidad alfa utilizando la función `estimate_richness` implementado en el paquete phyloseq con funciones del paquete vegan (Love et al., 2014).

### **Análisis estadísticos.**

#### **Desaparición de nutrientes, ambiente ruminal y producción de metano.**

La normalidad de los residuos se testeó utilizando el procedimiento UNIVARIATE de SAS (SAS® OnDemand for Academics) y, posteriormente, los datos fueron analizados utilizando modelos mixtos mediante los procedimientos MIXED (en el caso de distribución normal) o GLIMMIX (en el caso de no ser una distribución normal) de SAS (SAS® OnDemand for Academics). Para la desaparición de MO, PB, FND, FAD, NDIN, nmoles CH<sub>4</sub>/gM<sub>Od</sub> y nmolesCH<sub>4</sub>/gFNDd se consideró la dieta como efecto fijo, y la tanda y el residuo como efectos aleatorios. El modelo utilizado fue:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + C_j + \varepsilon_{ijk}$$

donde:  $Y_{ijk}$  = variable dependiente,  $\mu$  = media general,  $T_i$  = efecto fijo del  $i^{\circ}$  tratamiento ( $n = 3$  dietas),  $C_j$  = efecto aleatorio de la corrida y  $\varepsilon_{ijk}$  = error residual.

Los datos de pH, volumen de gas, AGVs, proporción de ácido acético, butírico y propiónico, A/P y N-NH<sub>3</sub> fueron analizados utilizando medidas repetidas en el

tiempo, con la unidad de fermentación como sujeto de las medidas repetidas. Se consideró la dieta, día de muestreo, y su interacción como efectos fijos; y la tanda y el residuo como efectos aleatorios. Dentro de las estructuras de errores investigadas se utilizó la estructura autoregresiva heterogénea de primer orden (ARH (1)) debido a que fue la mejor de acuerdo al BIC (criterio de información bayesiano). El modelo utilizado fue:

$$Y_{ijkl} = \mu + T_i + D_j + C_k + (T \times D)_{ij} + \epsilon_{ijkl}$$

donde:  $Y_{ijkl}$  = variable dependiente,  $\mu$  = media general,  $T_i$  = efecto fijo del  $i^{\circ}$  tratamiento ( $n = 3$  dietas) observado en  $l^{\circ}$  réplicas ( $n = 2$  unidades de fermentación),  $D_j$  = efecto fijo del tiempo de muestreo ( $n=5$  días),  $C_k$  = efecto aleatorio de la corrida,  $(T \times D)_{ij}$  = interacción entre tratamiento y día de muestreo y  $\epsilon_{ijkl}$  = error residual.

Cuando el efecto de la dieta fue significativo, las medias entre dietas se compararon mediante contrastes ortogonales preplanificados diseñados de la siguiente manera: RTM vs RPMs (RTM vs las dos dietas parcialmente mezcladas que contenían alfalfa) y RPM1 vs RPM2. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas cuando  $p \leq 0,05$ .

### **Microbiota ruminal**

Para evaluar el efecto de la dieta, período experimental y día de muestreo en la comunidad microbiana ruminal se realizó un análisis de varianza con permutaciones (PERMANOVA) utilizando la función *adonis* del paquete *vegan* y la matriz de distancias calculada con el método de Bray-Curtis. Así mismo, se utilizaron las funciones *betadisper* y *permutest* de *vegan* para verificar que la dispersión dentro del mismo grupo no fuera significativa. Se determinaron las abundancias diferenciales con el paquete *DESeq2* (Love et al., 2014).

Los grupos filogenéticos que resultara de relevancia estudiar en mayor detalle fueron analizados comparando las abundancias relativas utilizando Kruskal-Wallis y Mann-Whitney como test post-hoc. Los índices de diversidad alfa entre los grupos de cada dieta se compararon utilizando el test de Mann-Whitney.

## RESULTADOS

### Desaparición de nutrientes

En el Cuadro V se presenta la desaparición aparente de nutrientes de las dietas. Las variables fijas día y la interacción día\*dieta no afectaron la digestibilidad de la MS. Las dietas parcialmente mezcladas tuvieron una menor desaparición de MO ( $p=0,0006$ ) y de FDN ( $p=0,0017$ ) que la RTM. En cuanto al NIDN, la RPM2 mostró una mayor desaparición que la RPM1 ( $p=0,018$ ). Finalmente, la dieta no tuvo efecto en la desaparición de MS, PB y FDA.

Cuadro V. Desaparición aparente de nutrientes de las dietas.

	Dietas			EEM <sup>2</sup>	p dieta <sup>3</sup>	p contrastes <sup>4</sup>	
	RTM <sup>1</sup>	RPM1 <sup>1</sup>	RPM2 <sup>1</sup>			1	2
dMS(%)	52,35	51,62	51,50	2,79	0,1319		
dMO(%)	55,21	50,71	50,04	0,88	0,0021	0,0006	0,5986
dPB(%)	54,65	53,04	56,91	1,12	0,0805		
dFDN(%)	34,33	28,39	29,56	1,37	0,0052	0,0017	0,4265
dFDA(%)	32,10	31,41	29,17	1,09	0,1215		
dNIDN(%)	33,68	30,52	40,23	2,58	0,0498	0,5942	0,018

RPM1: ración parcialmente mezclada 1 (RTM:alfalfa en estadio vegetativo medio = 60:40), RPM2: ración parcialmente mezclada 2 (RTM:alfalfa en estadio botón temprano = 60:40), RTM ración totalmente mezclada (control).

d: desaparición aparente, MS: Materia Seca, MO: Materia Orgánica, PB: Proteína Bruta, FDN: Fibra Detergente Neutro, FDA: Fibra Detergente Ácido, NIDN: Nitrógeno Insoluble en Detergente Neutro.

<sup>1</sup>Media estimada por mínimos cuadrados; <sup>2</sup>EEM: error estándar de las medias; <sup>3</sup>p dieta: nivel de significancia del efecto fijo de la dieta; <sup>4</sup>p contrastes: nivel de significancia de los contrastes ortogonales (1: RTM vs RPM1 + RPM2, 2: RPM1 vs RPM2).

### Parámetros del ambiente ruminal

En el Cuadro VI se presentan el pH, la producción de gas, ácidos grasos volátiles y amoníaco ruminal de las dietas. Las variables fijas día y la interacción día\*dieta no tuvieron efecto en ninguna de las variables dependientes evaluadas. Las dietas parcialmente mezcladas generaron un mayor pH del líquido ruminal ( $p=0,0037$ ), menores concentraciones y proporciones de ácido propiónico ( $p=0,0015$  y  $p<,0001$ ), una mayor proporción de ácido butírico ( $p=0,0370$ ) y mayor relación A/P y A+B/P ( $p<,0001$ ) que la RTM. Así mismo, la RPM1 produjo una mayor proporción de ácido butírico y relación A/P, y menor pH que RPM2. Por último, la dieta no tuvo efecto en la producción de gas, ácidos grasos volátiles totales (acético + propiónico + butírico), en la concentración y proporción de ácido acético, y en la concentración de ácido butírico y N-NH<sub>3</sub> (mg/100mL).

Cuadro VI. pH, producción de gas, ácidos grasos volátiles y amoníaco ruminal de las dietas.

	Dietas				p dieta <sup>3</sup>	p contrastes <sup>4</sup>	
	RTM <sup>1</sup>	RPM1 <sup>1</sup>	RPM2 <sup>1</sup>	EEM <sup>2</sup>		1	2
pH	6,53	6,55	6,65	0,02	<,0001	0,0037	0,0004
Gas (mL/d)	637,29	626,50	626,71	28,22	0,743		
AGVt (mM)	38,02	33,78	36,50	1,60	0,080		
Ác. Acético (mM)	23,96	21,52	23,47	0,99	0,081		
Ác. Propiónico (mM)	10,76	9,17	9,80	0,46	0,004	0,0015	0,2059
Ác. Butírico (mM)	3,34	3,36	3,40	0,30	0,702		
Ác. Acético (% AGVt)	62,52	63,31	63,80	0,44	0,063		
Ác. Propiónico (% AGVt)	28,81	26,58	27,03	0,49	<,0001	<,0001	0,3063
Ác. Butírico (% AGVt)	9,01	9,72	9,05	0,31	0,002	0,0370	0,0021
A/P	2,18	2,41	2,37	0,07	<,0001	<,0001	<,0001
A+B/P	2,49	2,77	2,71	0,07	<,0001	<,0001	0,3004
N-NH <sub>3</sub> (mg/100mL)	18,84	19,45	22,37	1,94	0,359		

RPM1: ración parcialmente mezclada 1 (RTM: alfalfa en estadio vegetativo medio = 60:40), RPM2: ración parcialmente mezclada 2 (RTM: alfalfa en estadio botón temprano = 60:40), RTM ración totalmente mezclada (control).

AGVt: ácidos grasos volátiles totales (acético + propiónico + butírico), N-NH<sub>3</sub>: nitrógeno amoniacal.

<sup>1</sup>Media estimada por mínimos cuadrados; <sup>2</sup>EEM: error estándar de las medias; <sup>3</sup>p dieta: nivel de significancia del efecto fijo de la dieta; <sup>4</sup>p contrastes: nivel de significancia de los contrastes ortogonales (1: RTM vs RPM1 + RPM2, 2: RPM1 vs RPM2).

## Producción de metano

En el Cuadro VII se muestra la producción de metano de las dietas. La variable fija día afectó las variables dependientes mmoles CH<sub>4</sub>/día (p=0.0128) y mmoles CH<sub>4</sub>/mM AGVt (p=0.0050), pero la interacción día\*dieta no tuvo efecto en ninguna de las variables dependientes evaluadas. La dieta tampoco afectó la producción de metano.

Cuadro VII. Producción de metano de las dietas.

	Dietas			EEM <sup>2</sup>	p dieta <sup>3</sup>
	RTM <sup>1</sup>	RPM1 <sup>1</sup>	RPM2 <sup>1</sup>		
nmoles CH <sub>4</sub> /ml	237,2	237,89	239,93	45,4125	0,9576
nmoles CH <sub>4</sub> /día	0,147	0,145	0,149	0,025	0,9039
nmoles CH <sub>4</sub> /g MSd	0,028	0,028	0,030	0,004	0,6644
nmoles CH <sub>4</sub> /g MOd	0,032	0,030	0,031	0,006	0,7139
nmoles CH <sub>4</sub> /g FNDd	0,118	0,136	0,124	0,024	0,4737
nmolesCH <sub>4</sub> /mM AGVt	0,004	0,004	0,004	0,001	0,3669

RPM1: ración parcialmente mezclada 1 (RTM:alfalfa en estado vegetativo medio = 60:40), RPM2: ración parcialmente mezclada 2 (RTM:alfalfa en estadio botón temprano = 60:40), RTM ración totalmente mezclada (control).

MSd: Materia Seca desaparecida, MOd: Materia Orgánica desaparecida, FNDd: Fibra Detergente Neutro desaparecida, FDA: Fibra Detergente Ácido, AGVt: ácidos grasos volátiles totales (acético + propiónico + butírico).

<sup>1</sup>Media estimada por mínimos cuadrados; <sup>2</sup>EEM: error estándar de las medias; <sup>3</sup>p dieta: nivel de significancia del efecto fijo de la dieta.

## Microbiota ruminal

### Descripción general

Se determinó la composición y estructura de la comunidad bacteriana del líquido ruminal y contenido ruminal sólido obtenida en los días 1 y 7 de cada período experimental a través de la secuenciación de la región V4 del ADNr 16S.

Después de filtrar por calidad y tamaño, eliminar el ruido y quimeras se mantuvo el 55% de las lecturas iniciales, dejando en promedio 24267 ( $\pm$  5126) de secuencias por muestra. Se filtraron los ASVs que estaban en baja proporción y se obtuvieron en total 2895 ASV diferentes. Un 39,8% de las ASVs no pudieron ser clasificadas a nivel de género. Los filos más abundantes fueron: Firmicutes, Bacteroidota, Proteobacteria y Actinobacteriota, que en conjunto representaron el 90,4% de la microbiota bacteriana total (Figura 1). En general los géneros más abundantes fueron *Megasphaera*, *Succinivibrio*, *Limosilactobacillus*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Prevotella*, *Rikenellaceae* RC9 gut group, *Christensenellaceae* R-7 group y SP3-e08.

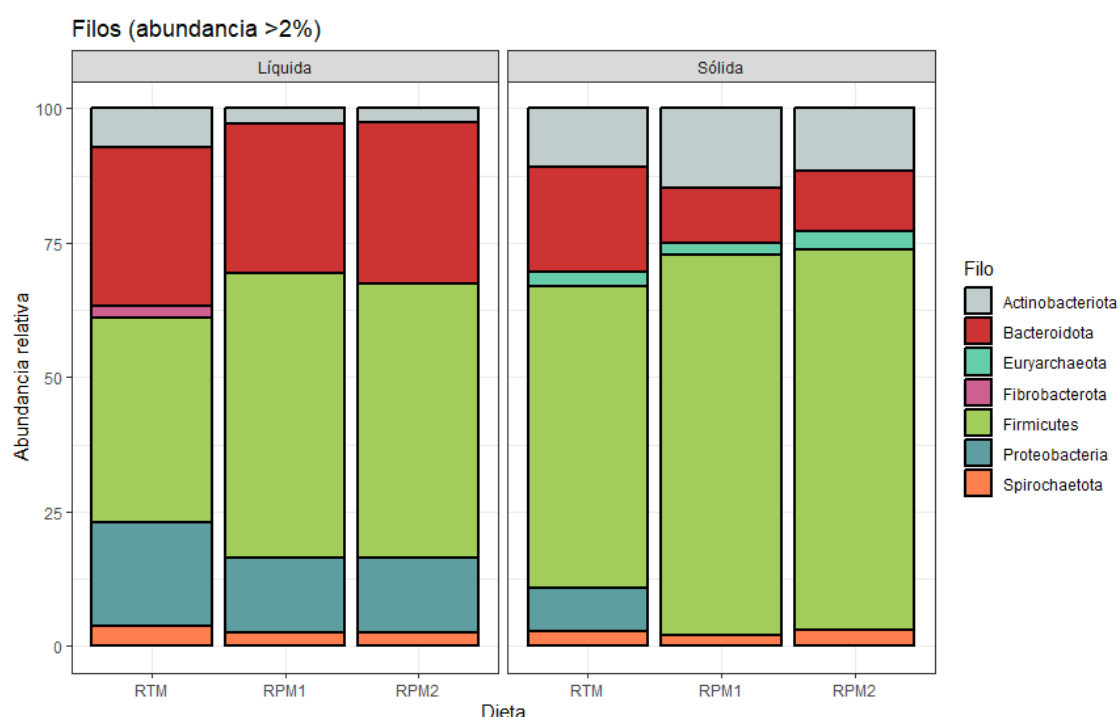


Figura 1. Abundancia relativa de filos bacterianos que se encontraron en una proporción mayor al 2% separado por la dieta y fase (líquida y sólida).

En el Cuadro VIII se muestran las abundancias relativas según tratamiento y fase de los 5 filos más abundantes, y los resultados de la comparación de las abundancias entre los distintos tratamientos y fases. Se observaron diferencias significativas en la abundancia de algunos filos según la fase, por ejemplo, una mayor abundancia de Bacteroidota y Proteobacteria en la fase líquida y una mayor abundancia de Firmicutes en la fase sólida. También se encontraron diferencias en la abundancia de algunos filos según la dieta, como una mayor abundancia de Firmicutes en las dietas RPMs, y una mayor abundancia en la dieta RTM de Bacteroidota en la sólida y de Proteobacteria, Actinobacteriota y Spirochaetota en la fase líquida.

**Cuadro VIII. Abundancia relativa de los 5 filos más abundantes por tratamiento y fase.**

	Dietas		
	RTM <sup>1</sup>	RPM1 <sup>1</sup>	RPM2 <sup>1</sup>
<i>Fase líquida</i>			
Firmicutes	35,7(5,0) <sup>ay</sup>	48,31(3,1) <sup>by</sup>	46,8(8,0) <sup>by</sup>
Bacteroidota	27,8(3,4) <sup>x</sup>	25,4(2,1) <sup>x</sup>	27,6(4,7) <sup>x</sup>
Bacteroidota/Firmicutes	0,80 (0,2) <sup>b</sup>	0,53 (0,1) <sup>a</sup>	0,62(0,2) <sup>ab</sup>
Proteobacteria	18,3(4,2) <sup>bx</sup>	12,8(2,6) <sup>ax</sup>	12,9(3,8) <sup>ax</sup>
Actinobacteriota	6,9(5,8) <sup>b</sup>	2,6(1,5) <sup>ay</sup>	2,4(1,4) <sup>ay</sup>
Spirochaetota	3,5(1,3) <sup>b</sup>	2,2(0,4) <sup>a</sup>	2,3(0,6) <sup>a</sup>
<i>Fase sólida</i>			
Firmicutes	53,1(8,3) <sup>ax</sup>	68,8(9,9) <sup>bx</sup>	67,4(11,3) <sup>bx</sup>
Bacteroidota	18,6(4,8) <sup>by</sup>	9,9(5,8) <sup>ay</sup>	10,7(7,1) <sup>ay</sup>
Bacteroidota/Firmicutes	0,37(0,1) <sup>b</sup>	0,15(0,1) <sup>a</sup>	0,18(0,1) <sup>a</sup>
Proteobacteria	7,5(5,6) <sup>y</sup>	1,1(0,9) <sup>y</sup>	1,9(1,4) <sup>y</sup>
Actinobacteriota	10,2(6,9)	14,5(9,0) <sup>x</sup>	11,1(5,1) <sup>x</sup>
Spirochaetota	2,7(1,8)	2,1(1,8)	2,8(2,5)

RPM1: ración parcialmente mezclada 1 (RTM:alfalfa en estado vegetativo medio = 60:40), RPM2: ración parcialmente mezclada 2 (RTM:alfalfa en estadio botón temprano = 60:40), RTM ración totalmente mezclada (control).

Promedios de las abundancias relativas en porcentaje y el desvío estándar entre paréntesis.

<sup>a,b</sup> Indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) mediante el test de Mann-Whitney entre dietas.

<sup>x,y</sup> Indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) mediante el test de Mann-Whitney entre fases.

En el Cuadro IX se muestran las abundancias relativas según tratamiento y día de muestreo de los 5 filos más abundantes y los resultados de la comparación de las abundancias entre los días de muestreo.

**Cuadro IX. Abundancia relativa de los 5 filos más abundantes por tratamiento y fase.**

	Dietas					
	RTM		RPM1		RPM2	
	Día 1	Día 7	Día 1	Día 7	Día 1	Día 7
Firmicutes	46,0(11,9)	39,3(8,4)	62,1(14,6)	53,3(7,1)	63,3(14,1) <sup>a</sup>	47,8(8,8) <sup>b</sup>
Bacteroidota	23,8(6,6)	23,6(5,9)	16,6(9,8)	19,2(8,2)	16,4(11,6)	23,3(7,4)
Proteobacteria	14,7(8,2)	11,7(5,6)	6,7(6,1)	7,2(6,9)	6,4(5,4)	9,0(7,5)
Actinobacteriota	4,7(3,2) <sup>b</sup>	14,2(5,6) <sup>a</sup>	6,0(5,4)	12,4(11,6)	6,6(6,0)	7,0(5,7)
Spirochaetota	2,9(1,6)	3,6(1,5)	1,6(0,7) <sup>b</sup>	2,9(1,6) <sup>a</sup>	1,6(0,9) <sup>b</sup>	4,0(1,9) <sup>a</sup>

Promedios de las abundancias relativas en porcentaje y el desvío estándar entre paréntesis.

<sup>a,b</sup> Indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) mediante el test de Mann-Whitney entre días de muestreo de cada tratamiento.

## Diversidad alfa

La Riqueza, los Índices de Shannon, Simpson y Equitatividad se calcularon y analizaron como descriptores de la comunidad (Figura 2). Se encontraron valores de riqueza mayores en la dieta RPM1 en relación a la dieta RTM en ambos días de muestreo en las muestras de la fase líquida. Así mismo, la dieta

RPM1 tuvo valores mayores del índice de Shannon que la dieta RTM en las muestras de la fase líquida en el día 1 de muestreo, mientras que la dieta RTM tuvo valores mayores que la dieta RPM2 en las muestras de la fase sólida en el mismo día de muestreo. En cuanto al índice de Simpson, en el día 1 las dietas RPMs obtuvieron valores mayores que la RTM en la fase líquida, mientras que en la fase sólida la dieta RTM tuvo valores mayores que las dietas RPMs en el mismo día de muestreo. En relación a los valores de equitatividad, en la fase sólida la dieta RTM tuvo valores mayores que la dieta RPM2 en el día 1, mientras que en el día 7 la dieta RPM2 tuvo valores mayores que la dieta RPM1.



Figura 2. Valores de Riqueza, índice de Shannon, Simpson y Equitatividad calculados por día de muestreo, dieta y fase.

## Diversidad beta

### PERMANOVA

Se usó PERMANOVA basado en el índice Bray-Curtis de disimilitud para determinar qué variables influenciaron de manera significativa la composición de la comunidad microbiana ruminal de las fases líquida y sólida. La dieta, el día, el período y la interacción dieta\*día fueron significativas en ambas fases, y la interacción día\*período fue significativa en la fase líquida (Cuadro X). Posteriormente, los datos de la fase líquida y sólida se separaron por período experimental, tratamiento y día de muestreo, y se comparó la composición de la comunidad microbiana total entre los tres períodos de muestreo, la composición de la microbiota en cada dieta, y entre el día 1 y 7 de muestreo para cada dieta.

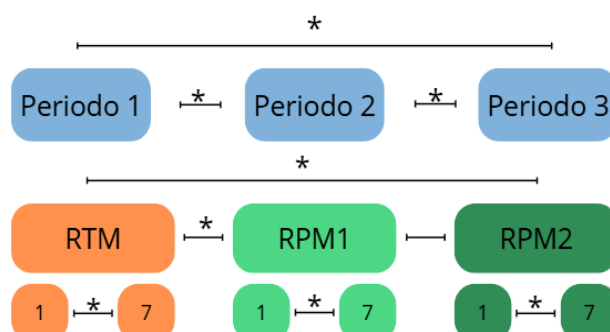


Cuadro X. Variables explicativas utilizadas para el análisis de PERMANOVA de la comunidad microbiana y su significancia.

Variable	<i>p</i> -valor	
	Fase líquida	Fase sólida
Dieta	0,001*	0,001*
Día	0,001*	0,003*
Período	0,001*	0,015*
Dieta*Día	0,013*	0,031*
Dieta*Período	0,282	0,510
Día*Período	0,001*	0,115
Dieta*Día*Período	0,551	0,475

\* Indica efectos significativos mediante PERMANOVA.

### (A) FASE LÍQUIDA



### (B) FASE SÓLIDA

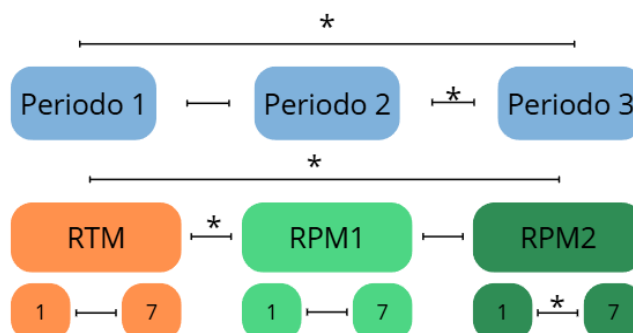


Figura 3. Resumen de las comparaciones pareadas del análisis de PERMANOVA. (A) Fase líquida, (B) Fase sólida. Se comparó la composición de la comunidad microbiana de cada fase entre los tres periodos experimentales, entre los tratamientos y entre los días de muestreo. Los asteriscos (\*) indican diferencias significativas.



## Métodos de reducción dimensional.

Los gráficos de NMDS mostraron que las comunidades microbianas tendieron a agruparse de acuerdo a la dieta y al día de muestreo. También se logró observar una clara separación entre las dietas RPMs y la RTM (Figura 4-Fase líquida y 5-Fase sólida).

**NMDS utilizando distintas distancias (Fase líquida)**

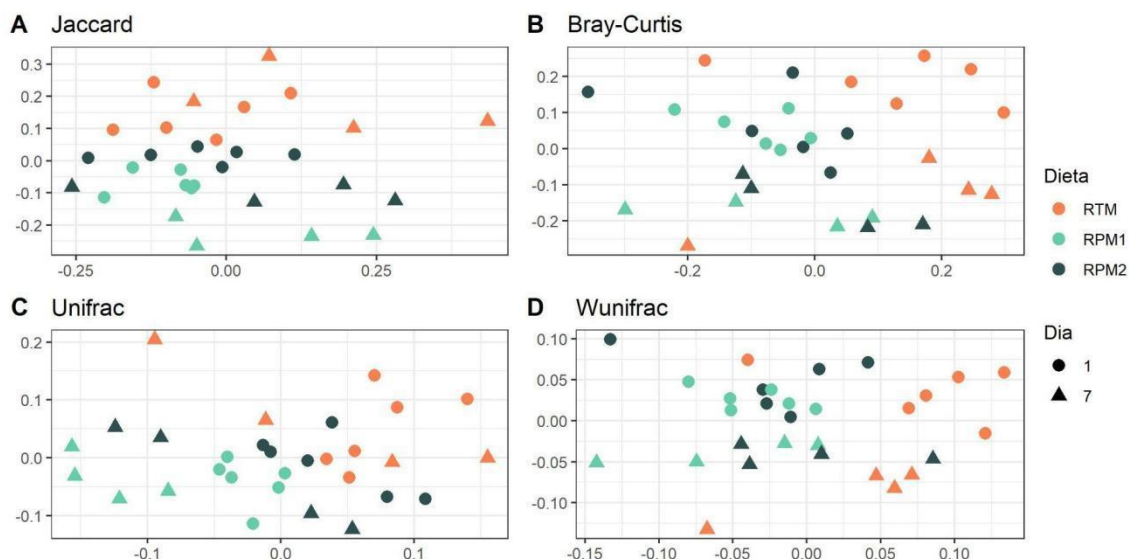


Figura 4. Gráficos de NMDS de las comunidades microbianas utilizando distintas medidas de distancia: (A) Jaccard, (B) Bray-Curtis, (C) Unifrac y (D) Wunifrac para muestras de la fase líquida.

**NMDS utilizando distintas distancias (Fase sólida)**

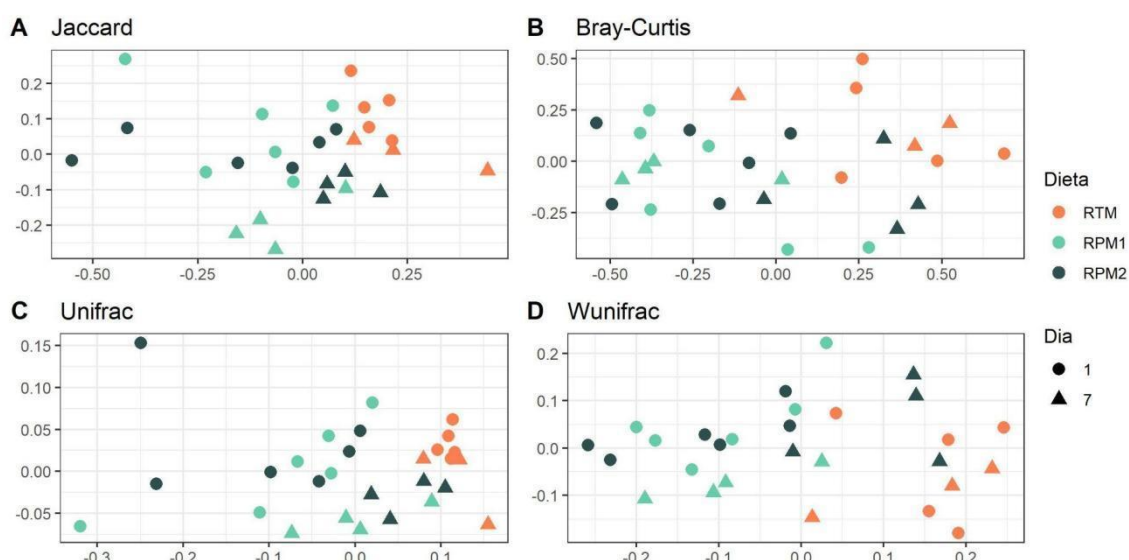


Figura 5. Gráficos de NMDS de las comunidades microbianas utilizando distintas medidas de distancia: (A) Jaccard, (B) Bray-Curtis, (C) Unifrac y (D) Wunifrac para muestras de la fase sólida.

## Cambios específicos en las comunidades.

Se analizaron las diferencias en las abundancias relativas de los géneros bacterianos de las muestras de la fase líquida y sólida, y se compararon entre tratamientos (RPM1 vs RTM, RPM2 vs RTM y RPM1 vs RPM2) (Figura 6). No hubo diferencias en la abundancia a nivel de géneros bacterianos entre las dietas RPM1 y RPM2. En cuanto a las muestras de la fase líquida, los géneros *Prevotella*, *Bifidobacterium*, *Treponema* y *Succinivibrio* fueron más abundantes en la dieta RTM que en las RPMs. En la fase sólida los géneros *Prevotella*, *Veillonellaceae* UCG-001, *Succinivibro* y *Schwartzia* fueron más abundantes en la dieta RTM que en las RPMs, y los géneros *Limosilactobacillus*, *Lactobacillus*, HT002, y *Streptococcus* fueron más abundantes en las RPM que en la RTM.

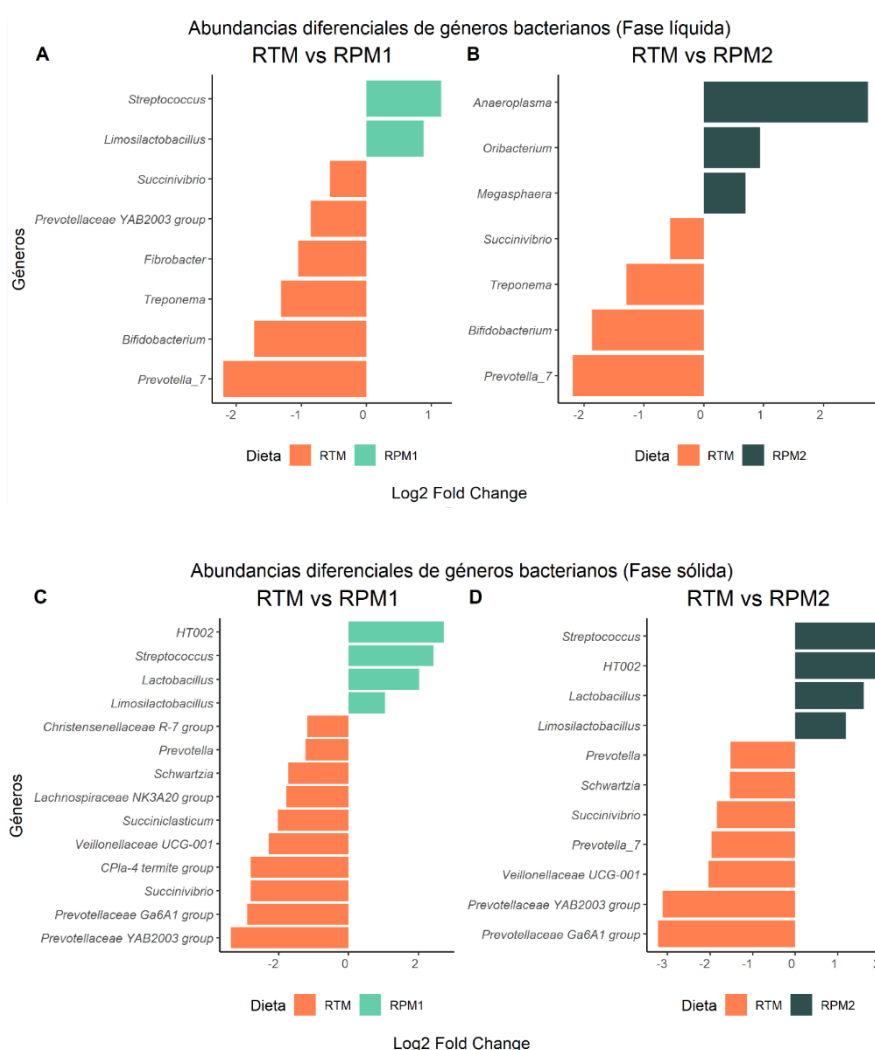


Figura 6. Abundancias diferenciales de géneros bacterianos. A y B: Fase líquida; C y D: Fase sólida. Un valor positivo de log2 Fold Change significa que ese género fue significativamente más abundante en la dieta RPM 1 o RPM 2 que en RTM; y un valor negativo indicó que ese género fue significativamente más abundante en la dieta RTM que en RPM 1 o RPM 2.

## Arqueas

Si bien el estudio de la comunidad arqueal no fue el objetivo principal de este estudio, al utilizarse *primers* universales además de amplificar bacterias amplifican algunos miembros de este dominio. El análisis en junto de bacterias y arqueas ruminales es práctico ya que ambos grupos están vinculados funcionalmente en la metanogénesis. En el Cuadro XI se muestran las abundancias relativas del dominio Archaea de las fases líquida y sólida según el tratamiento. No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos. La abundancia del filo Euryarchaeota representó el 1.8% ( $\pm 2\%$ ) de la microbiota total (Figura 1). Sólo en la fase sólida el filo Euryarchaeota tuvo una abundancia mayor al 2%, presentando una diferencia significativa entre fases ( $p=0.034$ ). Así mismo, no existieron diferencias en la abundancia de Euryarchaeota entre dietas. En el Cuadro XII se muestran las abundancias de los géneros de Archaeas de las fases líquida y sólida en cada dieta, y los resultados de la comparación de las abundancias relativas según la dieta.

Cuadro XI. Abundancia relativa de Archaeas en la fase líquida y sólida según la dieta.

	Dieta		
	RTM	RPM1	RPM2
Fase líquida	2,1 (0,9)	2,7 (0,8)	2,8 (1,1)
Fase sólida	3,4 (2,1)	2,4 (3,2)	3,6 (2,4)

RPM1: ración parcialmente mezclada 1 (RTM:alfalfa en estado vegetativo medio = 60:40), RPM2: ración parcialmente mezclada 2 (RTM:alfalfa en estadio botón temprano = 60:40), RTM ración totalmente mezclada (control).

Promedio del porcentaje de las abundancias relativas y su desvío estándar entre paréntesis.

Cuadro XII. Abundancia relativa de géneros de Archaeas (abundancia mayor a 0.1%) en la fase líquida y sólida según la dieta.

	Dieta		
	RTM	RPM1	RPM2
<i>Fase líquida</i>			
<i>Methanobrevibacter</i>	0,7(0,7) <sup>b</sup>	1,3(0,8) <sup>a</sup>	1,0(0,7) <sup>ab</sup>
<i>Methanosphaera</i>	0,1(0,1)	0,2(0,2)	0,2(0,2)
<i>Methanomicrobium</i>	1,3(0,9)	1,0(0,6)	1,5(0,8)
<i>Methanimicrococcus</i>	0,005(0,01) <sup>b</sup>	0,2(0,2) <sup>a</sup>	0,1(0,3) <sup>ab</sup>
<i>Fase sólida</i>			
<i>Methanobrevibacter</i>	2,2(1,4)	1,7(2,6)	2,6(2,2)
<i>Methanosphaera</i>	0,3(0,3)	0,4(0,6)	0,5(0,3)
<i>Methanomicrobium</i>	0,9(1,0) <sup>a</sup>	0,3(0,3) <sup>b</sup>	0,4(0,5) <sup>ab</sup>

Promedio del porcentaje de las abundancias relativas en y el desvío estándar entre paréntesis.

<sup>a,b</sup> Indican diferencias significativas ( $p<0.05$ ) mediante el test de Mann-Whitney entre dietas.

# DISCUSIÓN

## Desaparición de nutrientes

La digestibilidad de un alimento determina la fracción del alimento que es absorbida por el animal y, por tanto, la porción de nutrientes que quedan disponibles para el crecimiento, reproducción, producción de leche, etc. (Mc Donald et al., 1999). La desaparición de MS y PB observada en el presente estudio es inferior, y la de FDA superior a la presentada por otros autores que realizaron fermentaciones *in vitro* de raciones totalmente mezcladas utilizando RuSiTec. Tamayao et al. (2021) ensayaron una RTM con 38,1% de FDN, 16,9% de FDA y 16,5% de PB y obtuvieron coeficientes de desaparición de 0,64, 0,89, 0,36 y 0,26 para MS, PB, FDN y FDA, respectivamente. Por su parte, Martínez et al. (2010) utilizando una RTM compuesta por 70% de heno de alfalfa y 30% de concentrado con 42,6% de FDN, 26,9% de FDA y 16,8 % de PB, obtuvieron una digestibilidad de 71,3, 36,0 y 25,3, para la MS, FDN y FDA, respectivamente.

En el presente estudio, la sustitución del 40% de una RTM por alfalfa en estadio vegetativo medio o botón temprano no afectó la desaparición de MS, PB ni de FDA. Las dietas que incluyeron pastura presentaron menor desaparición de MO que las dietas 100% RTM, aunque no hubo diferencias en la desaparición de MS, lo que puede deberse a un menor contenido de cenizas de la dieta RTM dejando en proporción más materia orgánica disponible para fermentar. La reducción de la desaparición de MO observada al sustituir RTM por pastura puede atribuirse al mayor contenido de carbohidratos menos digestibles (FDN) y al menor contenido de carbohidratos más digestibles (almidón) (Valadares Filho et al., 2000) en las RPMs. El contenido de almidón fue mayor (17,25% vs. 10,37%) y la relación FDN:almidón menor en la RTM que las RPMs (2,34 vs. 3,71), a pesar de que el contenido de FDN también fue mayor en las RTM (40,4% vs. 37,7%).

La reducción de la desaparición de FDN en las RPMs, considerando que no existió efecto de la dieta en la desaparición de la FDA, podría explicarse debido al mayor contenido de hemicelulosas, componente fibroso más digestible, de la RTM (13,78% vs. 10,25%) y/o menor digestibilidad de las hemicelulosas de la alfalfa. Keys, Van Soest y Young (1969) señalan que tanto la digestibilidad de la materia seca como de las paredes celulares de la alfalfa es menor que la de las gramíneas, y que lo segundo se debe principalmente a la mayor relación lignina:pared celular encontrada en la alfalfa. A su vez, las hemicelulosas de la alfalfa son menos digestibles por los rumiantes que las de las gramíneas (Sullivan, 1966). Los principales componentes que aportan FDN a la RTM son el ensilaje de maíz y la cascarilla de soja. En este sentido, Susmel et al. (1990) observaron que la FDN potencialmente degradable del heno de alfalfa era menor que la del silo de maíz (0,49 vs 0,81) y Neumann et al. (2021) que la cascarilla

de soja es altamente digestible, obteniendo un valor de digestibilidad *in vitro* de la FDN de 85,65%.

### **Parámetros del ambiente ruminal y producción de metano.**

La fermentación de los alimentos en el retículo-rumen produce AGVs y ácido láctico. Si estos ácidos se acumulan y sobrepasan la capacidad amortiguadora del líquido ruminal, el pH desciende. La regulación del pH ruminal depende mayoritariamente de la absorción de AGV a través de la pared ruminal y de la capacidad tampón tanto del líquido ruminal determinada por el bicarbonato presente en la saliva, como de los alimentos de la dieta (Dijkstra et al., 2012). En este trabajo, se pudo evidenciar un pH ruminal más cercano a la neutralidad con la inclusión de pasturas ( $p=0,0037$ ), principalmente con la inclusión de alfalfa en estadio de botón temprano ( $p < 0,001$ ). En RuSiTec el pH se define por la producción de AGVs y la capacidad tampón de la dieta ya que el aporte de saliva artificial es el mismo para todos los fermentadores y no existe absorción de AGVs. La dieta por su parte no afectó la producción de AGVs totales, por lo que el mayor pH del líquido ruminal en la dieta RPM2 se debe posiblemente a la capacidad amortiguadora de la alfalfa en el estadio fenológico más avanzado. De acuerdo a Stepanova & Volovik (2021) existe una asociación positiva entre el contenido de cenizas y PB y la capacidad buffer de la alfalfa, y una asociación negativa entre la fibra cruda y esta característica. Sin embargo, las RPMs no difirieron en gran medida en su contenido de cenizas y PB, encontrando la mayor diferencia en el contenido de FDN a favor de la alfalfa en estadio de botón temprano.

En este trabajo, la concentración de AGVs fue baja ( $\bar{x}=36,1$  mM) en comparación a los valores encontrados normalmente en animales (70-150 mM) (Martínez et al., 2010; Tamayao et al., 2021) y de acuerdo a los reportados por otros investigadores que utilizaron RuSiTec (88,7mM y 55,9 mM (Martínez et al., 2010; Tamayao et al. 2010). En cuanto a los ácidos grasos volátiles individuales, no existió efecto de la dieta para la concentración ni la proporción de ácido acético, pero sí para la concentración y proporción de ácido propiónico, que fue mayor con la RTM. Adicionalmente, las relaciones A/P y A+B/P fueron menores en el tratamiento RTM. En la misma línea, Pérez-Ruchel et al. (2014) observaron una mayor proporción molar de ácido propiónico cuanto mayor fue la relación RTM:forraje. Las dietas más ricas en almidón favorecen el desarrollo de especies bacterianas productoras de propionato y se asocian a un aumento en la proporción de propionato a expensas del acetato (France & Dijkstra, 2005).

La dieta no tuvo efecto en la concentración molar de ácido butírico, sin embargo, la proporción fue mayor en las RPMs, y particularmente con la inclusión de alfalfa en estadio vegetativo medio. El butirato ejerce un efecto positivo en la digestión y absorción de nutrientes, y en la microbiota gastrointestinal de rumiantes recién

nacidos, y se cree que posee un efecto similar en animales adultos (Górka et al., 2018). Llamas-Lamas & Combs (1990) determinaron la concentración de AGVs en el líquido ruminal de vacas que fueron alimentadas con alfalfa en tres estadios vegetativos distintos. Encontraron que los animales alimentados con alfalfa en estadio vegetativo temprano presentaron una concentración molar de ácido butírico mayor que cuando consumieron alfalfa en estadio de botón tardío y floración, y que la proporción de ácido butírico fue mayor en estadio de floración que en botón tardío. El balance entre el aporte de propionato, glucogénico, y del acetato y butirato, no-glucogénicos, influencia la eficiencia en la que los AGVs son utilizados para fines productivos (France & Dijkstra, 2005). Huhtanen et al. (1993) concluyeron que el incremento en la proporción de ácido butírico posiblemente aumenta la cetogénesis y disminuye la neoglucogénesis en el hígado de vacas en lactación, lo que se asoció a un mayor contenido de grasa y menor contenido de lactosa en la leche, sin cambios en el volumen. Las vacas de dicho estudio produjeron en promedio 20 kg/día y tuvieron un balance energético positivo, por lo que la glucosa no limitó la producción de leche.

Según Mc Donald et al. (1999) la concentración óptima de N-NH<sub>3</sub> en el líquido ruminal varía entre 8,5 y 30 mg/100 ml, por lo que los valores obtenidos en el experimento para las dietas, además de no presentar diferencias, se encontraron dentro del rango deseado.

La dieta no tuvo efecto en la producción diaria de gas, en la concentración (nmoles/mL), producción (mmoles/día) y rendimiento de las emisiones de metano (mmoles/g MSd, mmoles/g MOd y mmoles/g FDNd) ni en el metano producido por unidad de AGVt (mmoles CH<sub>4</sub>/mM AGVt).

En los rumiantes, el consumo de materia seca (CMS) es un factor determinante en la producción de metano (mol o g/día), observándose una relación positiva entre ambas variables (Molano & Clark, 2008). Adicionalmente, Boadi & Wittenberg (2002) evaluaron el efecto de la calidad de las dietas basadas en forraje (61,5%, 50,7% y 38,5% de desaparición *in vitro* de la MO), y observaron que las dietas de menor calidad se relacionaron con disminuciones en el CMS, digestibilidad de la MO digestible y consumo de Energía Bruta. En cuanto a las emisiones de metano, al ser expresadas como un porcentaje de la Energía Bruta consumida no presentaron diferencias; sin embargo, la reducción en el CMS y en la digestibilidad resultó en un aumento de las emisiones de metano expresadas por unidad de MO digestible consumida. En nuestro experimento, la cantidad de alimento que ingresó a cada fermentador fue la misma (10g MS/día). Aunque la dieta RTM presentó una mayor desaparición de la MO y no existieron diferencias en la producción diaria de metano, no lograron observarse diferencias en el rendimiento de las emisiones de metano expresadas como mmol CH<sub>4</sub>/g MO desaparecida.



Las concentraciones de metano en este estudio fueron notablemente mas bajas llevando a que la producción diaria de metano fuera sensiblemente inferior a las obtenidas por otros autores que utilizaron dietas RTM (3,7 mmoles/día; Tamayao et al., 2021) o dietas basadas en *ryegrass* perenne y concentrado (3,9 mmoles/día; Smith et al. 2020), bajo condiciones experimentales similares. Una explicación posible para esta diferencia podría ser explicada por la estabilidad de la muestra de gas durante el almacenamiento prolongado en los tubos Vacutainer™, ya que las muestras fueron colectadas en el periodo de octubre-diciembre de 2021 y analizados en diciembre de 2023. Dos estudio realizados por Freedman y Ferber (1976) y Freedman et al. (1978) evaluaron capacidad de los Vacutainers™ para almacenar gases fijos e hidrocarburos de bajo peso molecular. Si bien los estudios concluyen que el metano es uno de los gases que puede almacenarse durante semanas sin pérdidas significativas, los autores encontraron una reducción de aproximadamente el 4% de metano tras 41 días de almacenamiento. Nuestras muestras permanecieron almacenadas durante dos años, lo que hace razonable suponer pérdidas significativas. Además, no se dispone de evidencia que respalde la estabilidad del metano u otros gases en Vacutainers™ por períodos tan prolongados, por lo que una pérdida gradual a lo largo de ese tiempo constituye una hipótesis viable dadas las incertidumbres sobre el comportamiento del material en condiciones de almacenamiento extendido. Sumado a esto, en ambos estudios se evidenció una acumulación leve pero progresiva de oxígeno y nitrógeno en los Vacutainers™ durante el almacenamiento de 17 semanas. Si este proceso continuó durante los 2 años de almacenamiento, la entrada de estos gases atmosféricos podría haber tenido un efecto de dilución de la concentración original de metano.

### **Microbiota ruminal**

La composición general de la microbiota (Figura 1) fue similar a la obtenida por otros autores, que describieron a Firmicutes y Bacteroidota como los filos dominantes. De modo similar, Actinobacteria, Proteobacteria y Spirochaetota también fueron filos que se encontraban en abundancia significativa (Bharanidharan et al., 2018; de Menezes et al., 2011).

Las bacterias ruminales pueden encontrarse libres en el líquido ruminal (aprox 30%) o adheridas a partículas de alimentos (aprox 70%) y ambos grupos participan activamente en la digestión de alimentos (Nagaraja, 2016). Los filos Bacteroidota y Proteobacteria fueron más abundantes en la fase líquida, y Firmicutes en la fase sólida para todas las dietas, lo que coincide con otros autores (De Mulder et al., 2017). El filo Actinobacteriota fue más abundante en la FS de las dietas RPMs que en la FL, a diferencia de los resultados obtenidos por de Menezes et al. (2011) quienes encontraron una mayor abundancia de Actinobacteriota en la FL. Por otro lado, De Mulder et al. (2017) no encontró diferencias entre las fases. El filo Fibrobacterota presentó una abundancia mayor al 2% sólo en la fase líquida de la dieta RTM. Algunos autores han encontrado a

Fibrobacterota como uno de los filos más abundantes luego de Firmicutes y Bacteroidetes, y con una mayor prevalencia en la fase sólida (de Menezes et al., 2011; De Mulder et al., 2017). Sin embargo, otros trabajos han observado que el ADN de Fibrobacter es difícil de amplificar, posiblemente debido a la interacción del ADN con otras moléculas que interfieren en la reacción (de Menezes et al., 2011; Tajima et al., 2001).

La relación Bacteroidetes/Firmicutes en la fase líquida fue de 0,53 y 0,62 para las dietas RPM1 y RPM2, respectivamente, y de 0,80 para la dieta RTM. En la fase sólida, los valores fueron de 0,15 para RPM1, 0,18 para RPM2 y 0,37 para RTM. La dieta RTM presentó una relación Bacteroidetes/Firmicutes significativamente mayor que RPM1 en la fase líquida, y fue significativamente superior a ambas dietas RPM en la fase sólida. (ver Cuadro VIII). Fernando et al. (2010) describieron una mayor relación Bacteroidetes/Firmicutes en dietas altas en concentrados respecto a dietas altas en heno. Por otro lado, se ha observado una relación positiva entre el filo Proteobacteria y el contenido de extracto al éter de la dieta (Gleason & White, 2018). Posiblemente el mayor contenido de almidón y en extracto al éter de la RTM explique la mayor abundancia de Bacteroidota y Proteobacteria, y menor abundancia de Firmicutes. Los filos Bacteroidetes y Firmicutes comprenden a la gran mayoría del microbioma ruminal, y por tanto es esperable que tengan un efecto relevante en la producción. En este sentido, de acuerdo a un meta-análisis realizado por Gleason & White (2018) la abundancia relativa de Bacteroidetes y Firmicutes, y la relación Bacteroidetes/Firmicutes son los mejores predictores microbianos de la producción láctea. Varios taxones de Bacteroidetes se correlacionan positivamente con la producción de leche, y la mayoría de taxones de Firmicutes se asocian a altos niveles de grasa y proteína en leche y una menor producción láctea (Indugu et al., 2017). De acuerdo a lo expuesto anteriormente, podría esperarse una mayor producción láctea en los animales alimentados con RTM, y leche con mayor contenido de sólidos en animales alimentados con RPMs.

La diversidad (número y/o uniformidad, y tipos de taxones) es posiblemente uno de los conceptos más relevantes en la ecología de las comunidades. Los índices de diversidad se estiman para relacionar patrones de diversidad a la funcionalidad y estabilidad de los ecosistemas, o para entender cómo y porqué la diversidad cambia a lo largo del tiempo y espacio (Shade, 2017). En este estudio la dieta RPM1 tuvo valores de riqueza (número de taxones) e índices de Shannon y Simpson más altos que la dieta RTM en la fase líquida. En cambio, en la fase sólida la dieta RTM tuvo valores superiores de índice de Shannon y Simpson y de equitatividad (grado en que los individuos se distribuyen en taxones) que la RPM2. El índice de Shannon representa la incertidumbre acerca de la identidad de un individuo desconocido en una comunidad y el de Simpson la probabilidad de que dos individuos elegidos al azar pertenezcan a géneros distintos. El primero hace mayor hincapié en la riqueza, es decir número de taxones presentes, y los taxones raros, mientras que el segundo lo hace con los



componentes de equitatividad y taxones dominantes (Nagendra, 2001; Shannon, 1948).

Algunos parámetros de diversidad de la comunidad ruminal, como por ejemplo la riqueza se ven afectados debido a los componentes específicos de la dieta, de acuerdo con la preferencia por los sustratos disponibles (Gleason & White, 2018). De acuerdo con algunos autores, las dietas altas en forraje podrían aumentar la alfa diversidad de la microbiota ruminal debido a que las dietas ricas en concentrados promueven valores de pH ruminales bajos que inhiben el crecimiento de algunas bacterias ruminales que son sensibles al pH ácido (Wang, et al. 2020). Sin embargo, este efecto puede no haberse evidenciado completamente, ya que el experimento se realizó en un sistema RuSiTec en el que se aportó saliva artificial de manera uniforme a todos los fermentadores independientemente de la dieta suministrada, lo que permitió mantener un pH más controlado. La diversidad de la comunidad, tanto en la riqueza como en la equitatividad, mejora la robustez del ecosistema, posiblemente porque proporciona un efecto amortiguador frente a las perturbaciones y reduce el impacto (Yachi & Loreau, 1999). No obstante, Shabat et al. (2016) observaron que el microbioma de vacas ineficientes suele ser taxonómicamente más diverso y que utiliza un número mayor de vías metabólicas que los microbiomas de vacas más eficientes. En cambio, las comunidades ruminales de vacas más eficientes generalmente presentan más taxones dominantes y dependen de menos vías metabólicas, siendo energéticamente más rentable para el animal. En este sentido, se ha asociado la diversidad de manera negativa con la eficiencia de utilización de alimentos y la habilidad del microbioma de proveer al huésped con la energía requerida para la producción (Gleason & White, 2018). Tal como se esperaba, la dieta modificó la estructura de la comunidad microbiana en las fases líquida y sólida, aspecto evidenciado por los resultados de PERMANOVA. Este resultado coincide con los descritos en investigaciones previas, como la de De Menezes et al. (2011), quienes observaron un efecto significativo de la dieta en la composición de las comunidades bacterianas y de arqueas de vacas alimentadas con pastura o RTM.

Específicamente, la sustitución parcial de RTM por pastura ocasionó diferencias en la estructura de la comunidad microbiana, mientras que el estadio fenológico de la alfalfa no tuvo un efecto significativo (Figura 3). En los gráficos de NMDS también se evidencia la separación de la comunidad microbiana de acuerdo a la dieta. Particularmente, en los gráficos de la comunidad microbiana de la fase sólida y en los gráficos elaborados a partir de la matriz de distancias construidas con los métodos Bray-Curtis y Weighted-UniFrac de la fase líquida se observa el agrupamiento de las dietas RPMs frente a la RTM. Además, en los gráficos elaborados a partir de la matriz de distancias construidas con los métodos Jaccard y UniFrac de la fase líquida se visualiza la separación de las comunidades RPM1 y RPM2. La mayoría de los filos bacterianos predominantes no difirieron en sus abundancias relativas entre los días 1 y 7 de cada

tratamiento. Puntualmente, se observó un aumento en la abundancia relativa de Spirochaetota en RPM1 y RPM2, y de Actinobacteriota en RTM, y una disminución de Firmicutes en RPM2 en el día 7 (Cuadro IX). Así mismo, algunas diferencias encontradas en los índices de diversidad alfa, como Shannon y Simpson observadas al día 1, no se mantuvieron al día 7. Además, las comparaciones realizadas mediante el análisis de PERMANOVA mostraron diferencias en la estructura de la comunidad microbiana de la fase líquida de todos los tratamientos entre los días 1 y 7, mientras que en la comunidad microbiana de la fase sólida sólo se observaron diferencias en la estructura en la dieta RPM2. Adicionalmente, en los gráficos de NMDS se observó que las comunidades microbianas tendieron a agruparse de acuerdo al día de muestreo. Según Czerkowski y Breckenridge (1977) el estado estacionario en RuSiTec se establece a partir de que la salida diaria de productos de fermentación no cambia significativamente en el transcurso de los días durante un tiempo especificado, y se alcanza generalmente luego de 4-6 días de fermentación, por lo que podría suponerse que en el día 1 de muestreo aún no hubiese alcanzado dicho equilibrio.

Los géneros *Prevotella* y *Succinivibro* fueron más abundantes en la dieta RTM que en las RPMs. *Prevotella* spp. perteneciente al filo Bacteroidetes, es un género de bacterias amilolíticas capaz de degradar almidón, xilanos y pectinas (Hobson & Stewart, 1988). La familia Prevotellaceae es una de las más prevalentes en animales alimentados tanto con RTM como con pasturas (de Menezes et al., 2011). Los productos de fermentación de *Prevotella* spp. incluyen acetato, succinato y propionato (Hobson & Stewart, 1988). Este género se ha relacionado con una mayor producción de propionato (Shinkai et al., 2024). Un mayor número de bacterias productoras de propionato desviarían el H<sub>2</sub> de la metanogénesis reduciendo los niveles de las emisiones de metano (de Menezes et al., 2011). En este estudio, si bien la dieta RTM presentó mayor abundancia de *Prevotella* spp. y mayor producción de propionato que las dietas RPMs, el efecto en la producción de metano no fue significativo. *Succinivibrio* spp. fermenta las dextrinas del almidón de los alimentos y algunas cepas poseen enzimas que permiten la utilización de productos resultantes de la ruptura de las paredes celulares de las plantas (Hobson & Stewart, 1988). Se ha vinculado una mayor abundancia de miembros de la familia Succinivibrionaceae en animales que emiten bajas cantidades de metano (Wallace et al., 2015).

Muchas bacterias ruminales, son capaces de fermentar tanto polímeros como di y monosacáridos producidos a partir de la hidrólisis inicial. Algunos géneros fermentadores de azúcares son *Streptococcus*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* y *Treponema* (Owens & Basalan, 2016). *Bifidobacterium* y *Treponema* fueron más abundantes en la dieta RTM que en las RPMs en la FL. Los miembros del género *Bifidobacterium* incrementan con las dietas ricas en almidones, lo que sugiere su participación en la hidrólisis de estos compuestos (Hobson & Stewart, 1988). *Streptococcus* y *Lactobacillus* spp., más abundantes en las dietas que incluyeron

alfalfa, son relevantes debido a su tendencia a crecer de forma abrupta y producir ácido láctico en situaciones donde el rumen presenta gran cantidad de carbohidratos fermentables (Nagaraja, 2016).

La abundancia relativa total del dominio Archaea de los distintos tratamientos no presentó diferencias significativas. A pesar de su participación fundamental en la metanogénesis, varios estudios han identificado una correlación débil o incluso inexistente entre la abundancia de arqueas y las emisiones de metano (Danielsson et al., 2012; Morgavi et al., 2012; Zhou et al., 2011). En efecto, posiblemente la composición de la comunidad de arqueas, más que sólo su tamaño, tenga una mayor influencia en las emisiones de metano (Tapio et al., 2017). A nivel de género se observó una mayor abundancia relativa de *Methanobrevibacter* y *Methanimicrococcus* en la dieta RPM1 que en RTM en la fase líquida y de *Methanomicrobium* en la dieta RTM que en RPM1 en la fase sólida. Danielsson et al. (2017) estudiaron la comunidad microbiana ruminal de vacas lecheras alimentadas con la misma dieta pero que diferían en las emisiones de metano. Los autores no encontraron diferencias en las abundancias de *Methanobrevibacter* y *Methanosphaera* entre los grupos, pero sí un incremento en la relación *Methanobrevibacter gottschalkii*:*Methanobrevibacter ruminantium* en emisores de bajo a medio, y medio a alto. En definitiva, mayores abundancias relativas de *M. ruminantium* se asociaron a los animales que produjeron menores cantidades de metano. La plataforma Illumina MiSeq secuencía un máximo de 2x300 pb, que no cubre en su totalidad al gen ARNr 16S pero sí permite la secuenciación de una o más regiones variables. La selección de la región que se desea amplificar es muy importante debido a las diferencias de las regiones variables dentro y entre las especies (Cao et al. 2017), particularmente en este trabajo se secuenció la región V4. No obstante, aun secuenciando todo el gen ARNr 16S, el mismo presenta bajo poder discriminatorio a nivel de especies, incluso a nivel de género en algunos grupos (Mignard & Flandrois, 2006) y por lo mismo no podemos comparar los resultados obtenidos en este estudio con los de Danielsson et al. (2017).

Si bien este estudio tuvo como objetivo el estudio de la comunidad bacteriana, los *primers* utilizados (515F/806R) son capaces de amplificar, además, algunos grupos de arqueas. A pesar de que la amplificación simultánea de más de un dominio (como bacterias y arqueas) utilizando cebadores universales facilita el análisis integrado de la microbiota, resulta menos preciso que el análisis separado de cada grupo (Fischer et al., 2016). Los *primers* usados en este estudio presentan una cobertura del 83,6% y 83,5% de bacterias y archaeas, respectivamente, dejando sin amplificar 62406 especies bacterianas y 3306 especies de arqueas (Qin et al., 2024). Por lo tanto, si se desea realizar un estudio exhaustivo de un dominio microbiano específico, es aconsejable el uso de cebadores diseñados específicamente para dicho dominio.

## Discusión general

Este trabajo se basó en la hipótesis de que la sustitución parcial de una ración totalmente mezclada (RTM) por pasturas de alta calidad, como lo es la alfalfa en estadio vegetativo medio o botón temprano mantendría una alta degradabilidad de nutrientes y producción de ácidos grasos volátiles sin aumentar las emisiones de metano, y que, a su vez, este efecto sería más evidente al utilizar la alfalfa en el estadio más temprano. Los animales alimentados con leguminosas pierden una menor proporción de energía en forma de metano en comparación con aquellos que consumen gramíneas (Waghorn et al., 2002). Por ello, incrementar la proporción de leguminosas en la dieta de animales de pastoreo se presenta como una alternativa práctica para reducir las emisiones nacionales de metano y mejorar el rendimiento del ganado (Dini et al., 2012).

La desaparición de la MO fue menor al sustituir parte de la RTM por alfalfa si bien no hubo diferencias en la producción total de AGVs. En otras palabras, las dietas que incluyeron pastura tuvieron una mayor eficiencia de conversión de la materia orgánica degradada en ácidos grasos volátiles. La degradación de los alimentos en el rumen sucede, a grandes rasgos, por la actividad combinada de dos grupos microbianos: los fermentadores primarios y secundarios. Los primeros hidrolizan proteínas, almidón y polímeros de las paredes celulares de las plantas a aminoácidos y azúcares. Estos compuestos simples son luego fermentados a AGVs, hidrógeno y dióxido de carbono por los fermentadores primarios y secundarios. La mayoría de las bacterias ruminales utilizan monómeros u oligómeros liberados de las plantas por la hidrólisis de polímeros, incluyendo almidón, pectinas, celulosa, hemicelulosa y lípidos. Las bacterias que hidrolizan los polímeros y que también fermentan sus productos de degradación se denominan “especialistas” como *Ruminobacter amylophilus*, que utiliza sólo almidón o sus productos de degradación, y *Fibrobacter succinogenes*, que utiliza principalmente celulosa y sus productos de degradación. Por otro lado, se denominan “generalistas” a las bacterias que pueden hidrolizar un amplio rango de sustratos incluyendo almidón, celulosa, xilanos y pectinas, como por ejemplo cepas de *Butyrivibrio fibrisolvens*. Otras bacterias como *Selenomonas ruminantium* tienen poca capacidad de hidrolizar polímeros, pero pueden utilizar una amplia variedad de productos de hidrólisis producidas por la actividad de las bacterias hidrolíticas (Stewart et al., 1997; Morgavi et al., 2010). No hubo diferencias en las abundancias relativas de los géneros mencionadas entre las dietas, por lo que quizás la diferencia en la eficiencia con la que el proceso de fermentación convierte el sustrato degradado en AGV esté vinculada a una degradación parcial de los nutrientes en la primer fase de la fermentación y a una mejor actividad de los microorganismos fermentadores de monómeros en las dietas que incluyen pastura.

La alfalfa además de ser fuente de fibra y proteína contiene numerosos metabolitos secundarios, entre ellos saponinas (Goel & Makkar, 2012). Las saponinas se distribuyen a lo largo de toda la planta; siendo su concentración en las hojas aproximadamente el doble que en el tallo. Además, conforme avanza la maduración de la planta, se observa una disminución progresiva en su contenido (Singh et al., 2010). Si bien las saponinas ejercen un efecto deseable en el perfil de fermentación al reducir la relación acetato/propionato debido a la inhibición de algunas poblaciones bacterianas y protozoos (Rodrigues, 2016), también se ha observado una disminución en la digestibilidad de la materia seca y de la fibra debido en gran medida a una menor actividad fibrolítica en el rumen (Lu & Jorgensen, 1987). Lo expuesto anteriormente podría explicar, al menos parcialmente, porque la degradabilidad de nutrientes no fue superior con la alfalfa en estadio vegetativo medio que botón temprano como se esperaba.

## CONCLUSIONES

El presente estudio, focalizado en dos tipos de alimentación ampliamente utilizados en Uruguay como lo son las raciones totalmente mezcladas y las dietas mixtas, aporta información relevante vinculada a la degradabilidad de nutrientes, ambiente ruminal, producción de metano y ecología microbiana ruminal, aspectos fundamentales para la lograr la optimización y sostenibilidad de la producción lechera. Este estudio demostró que la sustitución parcial de una ración totalmente mezclada (RTM) por alfalfa en estadio vegetativo medio o botón temprano en un sistema de rumen artificial (RuSiTec) mantuvo una eficiencia fermentativa similar en términos de producción de ácidos grasos volátiles (AGVs), sin incrementar las emisiones de metano. Aunque la inclusión de alfalfa redujo ligeramente la desaparición de materia orgánica (MO), no afectó significativamente la digestibilidad de la materia seca (MS), proteína bruta (PB) o fibra detergente ácido (FDA). Además, las dietas con alfalfa mostraron un pH ruminal más cercano a la neutralidad, posiblemente debido a su mayor capacidad amortiguadora, especialmente en el estadio de botón temprano. Por otra parte, la sustitución parcial de una dieta RTM por alfalfa modificó tanto la estructura como la diversidad de la comunidad microbiana ruminal. Particularmente se observó una mayor abundancia de bacterias amilolíticas (como *Prevotella* spp. y *Succinivibrio* spp.) en la RTM, mientras que las dietas con alfalfa favorecieron géneros como *Streptococcus* spp. y *Lactobacillus* spp.. Finalmente, la abundancia relativa de arqueas no se vio afectada por la dieta.

En conclusión, mejorar la composición de las dietas del ganado mediante la inclusión de alfalfa en estado vegetativo medio o botón temprano representa una estrategia viable para mantener una fermentación ruminal eficiente sin aumentar las emisiones de metano, si bien no redujo las emisiones en las condiciones evaluadas. Esta medida preserva los productos de fermentación, como ácidos grasos volátiles totales, fundamentales para sostener la producción láctea, a la vez que reduce la proporción de granos utilizados en alimentación animal lo que disminuye el impacto ambiental local y optimiza el uso de insumos destinados al consumo humano. Además, se alinea con las demandas del mercado por productos más "verdes" y respetuosos con el medio ambiente. Futuras investigaciones podrían explorar el impacto de diferentes estadios fenológicos de la alfalfa y su interacción con otros sustratos para optimizar tanto el rendimiento productivo como la reducción de impactos ambientales.



## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, R. F., Jones, R. L., & Conway, P. L. (1984). High-performance liquid chromatography of microbial acid metabolites. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 336(1), 125–137. [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(00\)85136-1](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(00)85136-1)
- Association of Official Analytical Chemistry (A.O.A.C.). (1990). *Official method of analysis* (P. Chialo & H. Reynold, Eds.; 16th ed.).
- Balcombe, P., Speirs, J. F., Brandon, N. P., & Hawkes, A. D. (2018). Methane emissions: choosing the right climate metric and time horizon. *Environmental Science: Processes & Impacts*, 20(10), 1323–1339. <https://doi.org/10.1039/C8EM00414E>
- Bargo, F., Muller, L. D., Delahoy, J. E., & Cassidy, T. W. (2002). Performance of High Producing Dairy Cows with Three Different Feeding Systems Combining Pasture and Total Mixed Rations. *Journal of Dairy Science*, 85(11), 2948–2963. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(02\)74381-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(02)74381-6)
- Bharanidharan, R., Arokiyaraj, S., Kim, E. B., Lee, C. H., Woo, Y. W., Na, Y., Kim, D., & Kim, K. H. (2018). Ruminant methane emissions, metabolic, and microbial profile of Holstein steers fed forage and concentrate, separately or as a total mixed ration. *PLOS ONE*, 13(8), e0202446. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202446>
- Boadi, D. A., & Wittenberg, K. M. (2002). Methane production from dairy and beef heifers fed forages differing in nutrient density using the sulphur hexafluoride (SF<sub>6</sub>) tracer gas technique. *Canadian Journal of Animal Science*, 82(2), 201–206. <https://doi.org/10.4141/A01-017>
- Brink, G., Hall, M., Shewmaker, G., Undersander, D., Martin, N., & Walgenbach, R. (2010). Changes in Alfalfa Yield and Nutritive Value within Individual Harvest Periods. *Agronomy Journal*, 102(4), 1274–1282. <https://doi.org/10.2134/agronj2010.0080>
- Callahan, B. J., Sankaran, K., Fukuyama, J. A., McMurdie, P. J., & Holmes, S. P. (2016). Bioconductor Workflow for Microbiome Data Analysis: from raw reads to community analyses. *F1000Research*, 5, 1492. <https://doi.org/10.12688/f1000research.8986.2>
- Cao, Y., Fanning, S., Proos, S., Jordan, K., & Srikumar, S. (2017). A Review on the Applications of Next Generation Sequencing Technologies as Applied to Food-Related Microbiome Studies. *Frontiers in Microbiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01829>
- Capper, J. L., Cady, R. A., & Bauman, D. E. (2009). The environmental impact of dairy production: 1944 compared with 2007. *Journal of Animal Science*, 87(6), 2160–2167. <https://doi.org/10.2527/jas.2009-1781>
- Connor, E. E. (2015). Invited review: Improving feed efficiency in dairy production: challenges and possibilities. *Animal*, 9(3), 395–408. <https://doi.org/10.1017/S1751731114002997>

- Czerkawski, J. W., & Breckenridge, G. (1977). Design and development of a long-term rumen simulation technique (Rusitec). *British Journal of Nutrition*, 38(3), 371–384. <https://doi.org/10.1079/BJN19770102>
- Dall-Orsoletta, A. C., Almeida, J. G. R., Carvalho, P. C. F., Savian, J. V., & Ribeiro-Filho, H. M. N. (2016). Ryegrass pasture combined with partial total mixed ration reduces enteric methane emissions and maintains the performance of dairy cows during mid to late lactation. *Journal of Dairy Science*, 99(6), 4374–4383. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10396>
- Danielsson, R., Schnürer, A., Arthurson, V., & Bertilsson, J. (2012). Methanogenic Population and CH<sub>4</sub> Production in Swedish Dairy Cows Fed Different Levels of Forage. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(17), 6172–6179. <https://doi.org/10.1128/AEM.00675-12>
- Danielsson, R., Dicksved, J., Sun, L., Gonda, H., Müller, B., Schnürer, A., & Bertilsson, J. (2017). Methane Production in Dairy Cows Correlates with Rumen Methanogenic and Bacterial Community Structure. *Frontiers in Microbiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00226>
- de Menezes, A. B., Lewis, E., O'Donovan, M., O'Neill, B. F., Clipson, N., & Doyle, E. M. (2011). Microbiome analysis of dairy cows fed pasture or total mixed ration diets. *FEMS Microbiology Ecology*, 78(2), 256–265. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01151.x>
- del Campo-Moreno, R., Alarcón-Cavero, T., D'Auria, G., Delgado-Palacio, S., & Ferrer-Martínez, M. (2018). Microbiota en la salud humana: técnicas de caracterización y transferencia. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 36(4), 241–245. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2017.02.007>
- De Mulder, T., Goossens, K., Peiren, N., Vandaele, L., Haegeman, A., De Tender, C., Ruttink, T., de Wiele, T. Van, & De Campeneere, S. (2017). Exploring the methanogen and bacterial communities of rumen environments: solid adherent, fluid and epimural. *FEMS Microbiology Ecology*, 93(3), fiw251.
- Dijkstra, J., Ellis, J. L., Kebreab, E., Strathe, A. B., López, S., France, J., & Bannink, A. (2012). Ruminant pH regulation and nutritional consequences of low pH. *Animal Feed Science and Technology*, 172(1–2), 22–33. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2011.12.005>
- Dini, Y., Gere, J., Briano, C., Manetti, M., Juliarena, P., Picasso, V., Gratton, R., & Astigarraga, L. (2012). Methane Emission and Milk Production of Dairy Cows Grazing Pastures Rich in Legumes or Rich in Grasses in Uruguay. *Animals*, 2(2), 288–300. <https://doi.org/10.3390/ani2020288>
- Dini, Y., Gere, J. I., Cajarville, C., & Ciganda, V. S. (2018). Using highly nutritious pastures to mitigate enteric methane emissions from cattle grazing systems in South America. *Animal Production Science*, 58(12), 2329. <https://doi.org/10.1071/AN16803>
- Easterbrook, D. J. (2016). Greenhouse gases. In *Evidence-Based Climate Science* (pp. 163-173). Elsevier.



- Fariña, S. R., & Chilbroste, 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>
- Fernando, S. C., Purvis, H. T., Najar, F. Z., Sukharnikov, L. O., Krehbiel, C. R., Nagaraja, T. G., Roe, B. A., & DeSilva, U. (2010). Rumen Microbial Population Dynamics during Adaptation to a High-Grain Diet. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(22), 7482–7490. <https://doi.org/10.1128/AEM.00388-10>
- Fischer, M. A., Güllert, S., Neulinger, S. C., Streit, W. R., and Schmitz, R. A. (2016). Evaluation of 16S rRNA gene primer pairs for monitoring microbial community structures showed high reproducibility within and low comparability between datasets generated with multiple archaeal and bacterial primer pairs. *Frontiers in microbiology*, 7, 1297. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01297>
- Fraga, M., Fernández, S., Cajarville, C., Martínez, M., Abin-Carriquiry, J. A., & Zunino, P. (2015). In vitro modulation of rumen microbiota and fermentation by native microorganisms isolated from the rumen of a fed-exclusively-on-pasture bovine. *Annals of Microbiology*, 65(4), 2355–2362. <https://doi.org/10.1007/s13213-015-1077-2>
- France, J., & Dijkstra, J. (2005). Volatile fatty acid production. In *Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism* (pp. 157–175). CABI Publishing. <https://doi.org/10.1079/9780851998145.0157>
- Freedman, R. W., & Ferber, B. I. (1976). Sampling capability of vacutainers for fixed gases and low-molecular-weight hydrocarbons (Vol. 8175). US Department of the Interior, Bureau of Mines.
- Freedman, R. W., Ferber, B. I., & Duerr, W. H. (1978). Gas-sampling capability of vacutainers (Vol. 8281). Department of the Interior, Bureau of Mines.
- Fricke, A. M., Podlesny, D., & Fricke, W. F. (2019). What is new and relevant for sequencing-based microbiome research? A mini-review. *Journal of Advanced Research*, 19, 105–112. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2019.03.006>
- Gill, M. (1979). The principles and practice of feeding ruminants on complete diets. *Grass and Forage Science*, 34(3), 155–161. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2494.1979.tb01462.x>
- Gleason, C. B., & White, R. R. (2018). Variation in animal performance explained by the rumen microbiome or by diet composition<sup>1</sup>. *Journal of Animal Science*, 96(11), 4658–4673. <https://doi.org/10.1093/jas/sky332>
- Goel, G., & Makkar, H. P. S. (2012). Methane mitigation from ruminants using tannins and saponins. *Tropical Animal Health and Production*, 44(4), 729–739. <https://doi.org/10.1007/s11250-011-9966-2>
- Górka, P., Kowalski, Z. M., Zabielski, R., & Guilloteau, P. (2018). Invited review: Use of butyrate to promote gastrointestinal tract development in calves.

- Journal of Dairy Science*, 101(6), 4785–4800.  
<https://doi.org/10.3168/jds.2017-14086>
- Gotschlich, E. C., Colbert, R. A., & Gill, T. (2019). Methods in microbiome research: Past, present, and future. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*, 33(6), 101498. <https://doi.org/10.1016/j.berh.2020.101498>
- Grunert, K. G., Bredahl, L., & Brunsø, K. (2004). Consumer perception of meat quality and implications for product development in the meat sector—a review. *Meat Science*, 66(2), 259–272. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(03\)00130-X](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(03)00130-X)
- Grupo intergubernamental de expertos sobre el cambio climático (IPCC). (2014). *Cambio climático 2014: Informe de síntesis*.
- Hammond, K. J., Hoskin, S. O., Burke, J. L., Waghorn, G. C., Koolaard, J. P., & Muetzel, S. (2011). Effects of feeding fresh white clover (*Trifolium repens*) or perennial ryegrass (*Lolium perenne*) on enteric methane emissions from sheep. *Animal Feed Science and Technology*, 166–167, 398–404. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2011.04.028>
- Hernandez-Urdaneta, A., Coppock, C. E., McDowell, R. E., Gianola, D., & Smith, N. E. (1976). Changes in Forage-Concentrate Ratio of Complete Feeds for Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*, 59(4), 695–707. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(76\)84260-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(76)84260-9)
- Hobson, P. N., & Stewart, C. S. (1988). *Rumen microbial ecosystem*. Springer Science & Business Media.
- Holter, J. B., Urban, W. E., Hayes, H. H., & Davis, H. A. (1977). Utilization of Diet Components Fed Blended or Separately to Lactating Cows. *Journal of Dairy Science*, 60(8), 1288–1293. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(77\)84024-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(77)84024-1)
- Huhtanen, P., Miettinen, H., & Ylinen, M. (1993). Effect of Increasing Ruminal Butyrate on Milk Yield and Blood Constituents in Dairy Cows Fed a Grass Silage-Based Diet. *Journal of Dairy Science*, 76(4), 1114–1124. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(93\)77440-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(93)77440-8)
- Indugu, N., Vecchiarelli, B., Baker, L. D., Ferguson, J. D., Vanamala, J. K. P., & Pitta, D. W. (2017). Comparison of rumen bacterial communities in dairy herds of different production. *BMC Microbiology*, 17(1), 190. <https://doi.org/10.1186/s12866-017-1098-z>
- IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change). (2007). Climate change 2007: synthesis report. Summary for policymakers. *Contribution of Working Groups I, II and III to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*.
- Kalu, B. A., & Fick, G. W. (1981). Quantifying Morphological Development of Alfalfa for Studies of Hbage Quality <sup>1</sup>. *Crop Science*, 21(2), 267–271. <https://doi.org/10.2135/cropsci1981.0011183X002100020016x>
- Katanski, S., Milić, D., Čupina, B., Zorić, M., Milošević, B., & Živanov, D. (2020). Effect of harvest maturity stage and seeding rate on alfalfa yield and quality.

- Ratarstvo i Povrtarstvo*, 57(2), 35–42. <https://doi.org/10.5937/ratpov57-24782>
- Khalil, M. A. K., & Shearer, M. J. (1993). Sources of methane: an overview. *Atmospheric methane: Sources, sinks, and role in global change*, 180–198.
- Kissel, E. S., Mastrandrea, M. D., Mastrandrea, P., White, L. L., Genova, R. C., Field, C. B., Chatterjee, M., Ebi, K. L., Moreno, J. M., Girma, B., Bilir, T. E., Buendía, E. C., Mach, K. J., Estrada, Y. O., Barros, V. R., Levy, A. N., MacCracken, S., & Dokken, D. J. (2014). *CAMBIO CLIMÁTICO 2014 Impactos, adaptación y vulnerabilidad*. <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:203371994>
- Lee, M. A., & Roberts, D. J. (2015). Cut and carry: Investigating the effects of increasing the proportion of grass in the diets of high yielding dairy cows. *Agriculture and Horticulture Development Board (AHDB) Report*.
- Licitra, G., Hernandez, T. M., & Van Soest, P. J. (1996). Standardization of procedures for nitrogen fractionation of ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology*, 57(4), 347–358. [https://doi.org/10.1016/0377-8401\(95\)00837-3](https://doi.org/10.1016/0377-8401(95)00837-3)
- Llamas-Lamas, G., & Combs, D. K. (1990). Effect of Alfalfa Maturity on Fiber Utilization by High Producing Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*, 73(4), 1069–1080. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(90\)78766-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(90)78766-8)
- Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, 15(12), 550. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>
- Lovett, D. K., Stack, L. J., Lovell, S., Callan, J., Flynn, B., Hawkins, M., & O'Mara, F. P. (2005). Manipulating Enteric Methane Emissions and Animal Performance of Late-Lactation Dairy Cows Through Concentrate Supplementation at Pasture. *Journal of Dairy Science*, 88(8), 2836–2842. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)72964-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)72964-7)
- Lu, C. D., & Jorgensen, N. A. (1987). Alfalfa saponins affect site and extent of nutrient digestion in ruminants. *The Journal of nutrition*, 117(5), 919–927.
- Malik, P. K., & Singhal, K. K. (2009). Effect of lucerne (*Medicago sativa*) fodder supplementation on nutrient utilization and enteric methane emission in male buffalo calves fed on wheat straw based total mixed ration. *Indian Journal of Animal Sciences*, 79(4), 416–421.
- Martínez, M. E., Ranilla, M. J., Tejido, M. L., Ramos, S., & Carro, M. D. (2010). Comparison of fermentation of diets of variable composition and microbial populations in the rumen of sheep and Rusitec fermenters. I. Digestibility, fermentation parameters, and microbial growth. *Journal of Dairy Science*, 93(8), 3684–3698. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2933>
- Mc Donald, P., Edwards, R., Morgan, C., & Greenhalgh, J. (1999 ). *Nutrición animal* (5ta ed.). ACRIBIA SA.
- Mccann, J. C., Wickersham, T. A., & Loor, J. J. (2014). High-throughput Methods Redefine the Rumen Microbiome and Its Relationship with Nutrition and

- Metabolism. *Bioinformatics and Biology Insights*, 8, BBI.S15389. <https://doi.org/10.4137/BBI.S15389>
- McDougall, E. I. (1948). Studies on ruminant saliva. 1. The composition and output of sheep's saliva. *The Biochemical Journal*, 43(1), 99–109.
- McMurdie, P. J., & Holmes, S. (2013). phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS ONE*, 8(4), e61217. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>
- Mee, J., & Boyle, L. (2020). Assessing whether dairy cow welfare is “better” in pasture-based than in confinement-based management systems. *New Zealand Veterinary Journal*, 68(3), 168–177. <https://doi.org/10.1080/00480169.2020.1721034>
- Mendoza, A., Cajarville, C., & Repetto, J. L. (2016). Short communication: Intake, milk production, and milk fatty acid profile of dairy cows fed diets combining fresh forage with a total mixed ration. *Journal of Dairy Science*, 99(3), 1938–1944. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10257>
- Mertens, D. R. (2003). Challenges in measuring insoluble dietary fiber. *Journal of Animal Science*, 81(12), 3233–3249. <https://doi.org/10.2527/2003.81123233x>
- Mignard, S., & Flandrois, J. P. (2006). 16S rRNA sequencing in routine bacterial identification: A 30-month experiment. *Journal of Microbiological Methods*, 67(3), 574–581. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2006.05.009>
- Ministerio de Ambiente. (2024). Informe del Inventario Nacional de Gases de Efecto Invernadero. Serie 1990-2024. Montevideo: Ministerio de Ambiente de Uruguay. Recuperado de <https://www.gub.uy/ministerio-ambiente/politicas-y-gestion/inventarios-nacionales-gases-efecto-invernadero-ingei>
- Miron, J., Ben-Ghedalia, D., & Morrison, M. (2001). Invited Review: Adhesion Mechanisms of Rumen Cellulolytic Bacteria. *Journal of Dairy Science*, 84(6), 1294–1309. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(01\)70159-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(01)70159-2)
- Mitchell, J. F. B. (1989). The “Greenhouse” effect and climate change. *Reviews of Geophysics*, 27(1), 115–139. <https://doi.org/10.1029/RG027i001p00115>
- Molano, G., & Clark, H. (2008). The effect of level of intake and forage quality on methane production by sheep. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 48(2), 219. <https://doi.org/10.1071/EA07253>
- Morgavi, D. P., Forano, E., Martin, C., & Newbold, C. J. (2010). Microbial ecosystem and methanogenesis in ruminants. *Animal*, 4(7), 1024–1036. <https://doi.org/10.1017/S1751731110000546>
- Moscovici Joubran, A., Pierce, K. M., Garvey, N., Shalloo, L., & O’Callaghan, T. F. (2021). Invited review: A 2020 perspective on pasture-based dairy systems and products. *Journal of Dairy Science*, 104(7), 7364–7382. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19776>
- Muñoz, C., Hube, S., Morales, J. M., Yan, T., & Ungerfeld, E. M. (2015). Effects of concentrate supplementation on enteric methane emissions and milk

- production of grazing dairy cows. *Livestock Science*, 175, 37–46.  
<https://doi.org/10.1016/j.livsci.2015.02.001>
- Nagaraja, T. G. (2016). Microbiology of the Rumen. In *Rumenology* (pp. 39–61). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-30533-2\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-319-30533-2_2)
- Nagendra, H. (2001). Using remote sensing to assess biodiversity. *International Journal of Remote Sensing*, 22(12), 2377–2400.  
<https://doi.org/10.1080/01431160117096>
- National Research Council, Committee on Animal Nutrition, & Subcommittee on Dairy Cattle Nutrition. (2001). Nutrient requirements of dairy cattle: 2001. National Academies Press.
- Neumann, M., Santos, L. C., Askel, E. J., Venancio, B. J., Pontarolo, G. B., Cristo, F. B., Plodoviski, D. C., & Silva, E. P. e. (2021). Ruminal kinetics and degradability of energetic feedstuffs used in diets for ruminants. *Ciência Animal Brasileira*, 22. <https://doi.org/10.1590/1809-6891v22e-68993>
- Nielsen, S. (2003). *Food analysis laboratory manual (Food science texts series)* (3rd edition). Kluwer Academic/Plenum Publishers.
- Niwinska, B., Strzetelski, J. A., Kowalczyk, J., Borowiec, F., & Domanski, P. (2005). The effect of phenological stage and season on nutritive value, chemical composition and nutrient digestibility of lucerne (*Medicago sativa* L.) green forage in the alimentary tract of cattle. *Czech Journal of Animal Science*, 50(11), 511.
- Orloff, S., & Putnam, D. (2006). Cutting Schedule Strategies to Maximize Returns. *Proceedings of the 36th California Alfalfa & Forage Symposium*, 1–15.
- Owens, F. N., & Basalan, M. (2016). Ruminal Fermentation. In *Rumenology* (pp. 63–102). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-30533-2\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-319-30533-2_3)
- Pérez-Ruchel, A., Bonifacino, C., Arrieche, P., Artigas, E., Kozloski, G. V., González, M., & Cajarville, C. (2014). Ruminal pH, ammonia and volatile fatty acids concentrations in lambs fed diets composed of fresh alfalfa and a total mixed ration. *Proc. Aust. Soc. Anim. Prod.*, 30, 168.
- Pichard, G., & Van Soest, P. J. (1977). Protein solubility of ruminant feeds. *Proceedings of the Cornell Nutrition Conference*, 91–98.
- Qin, Z., Xu, X., Xu, F., Zhang, Y., Su, P., & Shen, C. (2024). Developing the script “degenerate primer 111” to enhance the coverage of universal primers for the small subunit rRNA gene on target microorganisms. *Frontiers in Microbiology*, 15, 1394303. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1394303>
- Reay, D., Smith, P., & van Amstel, A. (2010). Methane sources and the global methane budget. . In *Methane and climate change* (1st Edition, pp. 9–21). Routledge.



- Robertson, J. B., & Van Soest, P. J. (1981). The detergent system of analysis and its application to human foods. In W. P. T. James & O. Theander (Eds.), *The analysis of dietary fiber in foods* (p. 123). Marcel Dekker.
- Rodrigues, P. H. M. (2016). Control and Manipulation of Ruminal Fermentation. In M. and L. P. R. D. Millen Danilo Domingues and De Beni Arrigoni (Ed.), *Rumenology* (pp. 157–187). Springer International Publishing.  
[https://doi.org/10.1007/978-3-319-30533-2\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-319-30533-2_6)
- Schingoethe, D. J. (2017). A 100-Year Review: Total mixed ration feeding of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 100(12), 10143–10150.  
<https://doi.org/10.3168/jds.2017-12967>
- Schliep, K. P. (2011). phangorn: phylogenetic analysis in R. *Bioinformatics*, 27(4), 592–593. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq706>
- Shabat, S. K. Ben, Sasson, G., Doron-Faigenboim, A., Durman, T., Yaacoby, S., Berg Miller, M. E., White, B. A., Shterzer, N., & Mizrahi, I. (2016). Specific microbiome-dependent mechanisms underlie the energy harvest efficiency of ruminants. *The ISME Journal*, 10(12), 2958–2972.  
<https://doi.org/10.1038/ismej.2016.62>
- Shackleton, R. (2003). *The Economics of Climate Change: A Primer*. Congressional Budget Office.
- Shannon, C. E. (1948). A mathematical theory of communication. *The Bell System Technical Journal*, 27(3), 379–423. <https://doi.org/10.1002/j.1538-7305.1948.tb01338.x>
- Shinkai, T., Takizawa, S., Enishi, O., Higuchi, K., Ohmori, H., & Mitsumori, M. (2024). Characteristics of rumen microbiota and Prevotella isolates found in high propionate and low methane-producing dairy cows. *Frontiers in Microbiology*, 15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1404991>
- Singh, J. V, Chhillar, B. S., Yadav, B. D., & Joshi, U. N. (2010). *Forage legumes*. Scientific Publishers (India).
- Smith, P. E., Waters, S. M., Kenny, D. A., Boland, T. M., Heffernan, J., & Kelly, A. K. (2020). Replacing barley and soybean meal with by-products, in a pasture based diet, alters daily methane output and the rumen microbial community in vitro using the rumen simulation technique (RUSITEC). *Frontiers in Microbiology*, 11, 1614.
- Stepanova, G. V, & Volovik, M. V. (2021). Dependence of the buffer capacity on the chemical composition of dry matter of alfalfa. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 901(1), 12044.
- Stewart, C. S., Flint, H. J., & Bryant, M. P. (1997). The rumen bacteria. In *The Rumen Microbial Ecosystem* (pp. 10–72). Springer Netherlands.  
[https://doi.org/10.1007/978-94-009-1453-7\\_2](https://doi.org/10.1007/978-94-009-1453-7_2)
- Susmel, P., Stefanon, B., Mills, C. R., & Spanghero, M. (1990). Rumen degradability of organic matter, nitrogen and fibre fractions in forages. *Animal Science*, 51(3), 515–526.  
<https://doi.org/10.1017/S0003356100012551>

- Tajima, K., Aminov, R. I., Nagamine, T., Matsui, H., Nakamura, M., & Benno, Y. (2001). Diet-Dependent Shifts in the Bacterial Population of the Rumen Revealed with Real-Time PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(6), 2766–2774. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.6.2766-2774.2001>
- Tamayao, P. J., Ribeiro, G. O., McAllister, T. A., Yang, H. E., Saleem, A. M., Ominski, K. H., Okine, E. K., & McGeough, E. J. (2021). Effects of post-pyrolysis treated biochars on methane production, ruminal fermentation, and rumen microbiota of a silage-based diet in an artificial rumen system (RUSITEC). *Animal Feed Science and Technology*, 273, 114802. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2020.114802>
- Tapio, I., Snelling, T. J., Strozzi, F., & Wallace, R. J. (2017). The ruminal microbiome associated with methane emissions from ruminant livestock. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 8(1), 7. <https://doi.org/10.1186/s40104-017-0141-0>
- Ungerfeld, E. M., Rust, S. R., Burnett, R. J., Yokoyama, M. T., & Wang, J. K. (2005). Effects of two lipids on in vitro ruminal methane production. *Animal Feed Science and Technology*, 119(1–2), 179–185. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2004.12.007>
- Valadares Filho, S. C., Broderick, G. A., Valadares, R. F. D., & Clayton, M. K. (2000). Effect of Replacing Alfalfa Silage with High Moisture Corn on Nutrient Utilization and Milk Production. *Journal of Dairy Science*, 83(1), 106–114. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(00\)74861-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(00)74861-2)
- Vibart, R. E., Fellner, V., Burns, J. C., Huntington, G. B., & Green, J. T. (2008). Performance of lactating dairy cows fed varying levels of total mixed ration and pasture. *Journal of Dairy Research*, 75(4), 471–480. <https://doi.org/10.1017/S0022029908003361>
- Waghorn, G. C., Tavendale, M. H., & Woodfield, D. R. (2002). Methanogenesis from forages fed to sheep. *Proceedings of the New Zealand Grassland Association*, 167–171.
- Waghorn, G., & Woodward, S. (2006). 12 Ruminant Contributions to Methane and Global Warming—A New Zealand Perspective. In *Climate Change and Managed Ecosystems* (p. 233).
- Wales, W. J., Maret, L. C., Greenwood, J. S., Wright, M. M., Thornhill, J. B., Jacobs, J. L., Ho, C. K. M., & Auldist, M. J. (2013). Use of partial mixed rations in pasture-based dairying in temperate regions of Australia. *Animal Production Science*, 53(11), 1167. <https://doi.org/10.1071/AN13207>
- Wallace, R. J., Rooke, J. A., McKain, N., Duthie, C.-A., Hyslop, J. J., Ross, D. W., Waterhouse, A., Watson, M., & Roehe, R. (2015). The rumen microbial metagenome associated with high methane production in cattle. *BMC Genomics*, 16(1), 839. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-2032-0>
- Wang, L., Li, Y., Zhang, Y., & Wang, L. (2020). The Effects of Different Concentrate-to-Forage Ratio Diets on Rumen Bacterial Microbiota and the Structures of Holstein Cows during the Feeding Cycle. *Animals*, 10(6), 957. <https://doi.org/10.3390/ani10060957>

- Weatherburn, M. W. (1967). Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Analytical Chemistry*, 39(8), 971–974.  
<https://doi.org/10.1021/ac60252a045>
- Wolin, M. J., Miller, T. L., & Stewart, C. S. (1997). Microbe-microbe interactions. In *The Rumen Microbial Ecosystem* (pp. 467–491). Springer Netherlands.  
[https://doi.org/10.1007/978-94-009-1453-7\\_11](https://doi.org/10.1007/978-94-009-1453-7_11)
- Wright, E. S. (2015). DECIPHER: harnessing local sequence context to improve protein multiple sequence alignment. *BMC Bioinformatics*, 16(1), 322.  
<https://doi.org/10.1186/s12859-015-0749-z>
- Yachi, S., & Loreau, M. (1999). Biodiversity and ecosystem productivity in a fluctuating environment: The insurance hypothesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(4), 1463–1468.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.96.4.1463>
- Zhou, M., Chung, Y.-H., Beauchemin, K. A., Holtshausen, L., Oba, M., McAllister, T. A., & Guan, L. L. (2011). Relationship between rumen methanogens and methane production in dairy cows fed diets supplemented with a feed enzyme additive. *Journal of Applied Microbiology*, 111(5), 1148–1158.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05126.x>