

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA**

“Producción de proteína microbiana y ambiente ruminal según el tiempo y forma de acceso al alimento y la adición o no de moduladores de la fermentación en ovinos alimentados con una pastura templada de buena calidad”

por

**José M. MICHELINI CARRAU
Luis F. PÉREZ SUÁREZ
Germán SOLDINI BEVILACQUA**

3
cción de proteína

341

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

MODALIDAD Ensayo Experimental

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2009**



TESIS aprobada por:

Presidente de Mesa:

Ing. Agr. María del Jesús Marichal

Segundo Miembro (Tutor):



Dra. Analía Pérez Ruchel

Tercer Miembro:

Ing. Agr. Daniel Garín

Co-tutor:

Dra. Cecilia Cajarville

Co-tutor:

Dr. José Luis Repetto

Fecha:

29 de septiembre de 2009

Autore:



Br. José Manuel Michelini



Br. Luis Francisco Pérez

Br. Germán Soldini

||

FACULTAD DE VETERINARIA

Aprobado con 11 (once) de 40

AGRADECIMIENTOS

Queremos agradecer especialmente a nuestras familias por el apoyo y respaldo incondicional durante todo el trayecto universitario, el cual ha sido de mucha importancia para desarrollarnos como seres humanos y futuros profesionales.

A los Drs. Analía Pérez, Cecilia Cajarville y José L. Repetto por su tutoría y co-tutoría y el respaldo depositados en nosotros.

A todos los integrantes del Departamento de Nutrición Animal de la Facultad de Veterinaria, especialmente a Sebastián Brambillasca, Alejandro Britos, Nicolle Pomiés por ayudarnos a realizar los trabajos en el laboratorio y brindarnos su confianza.

A los integrantes del Departamento de Bovinos de la Facultad de Veterinaria (Martín Aguerre, Alejandro Mendoza y Carolina Fiol) por su ayuda en los trabajos de campo.

Al Departamento de Teriogenología y Fisiología de la reproducción por colaboración y el préstamo de material de su laboratorio.

A los Brs. con los que compartimos el ensayo experimental (Wilder Saavedra, Carolina Iturria, Florencia Sanguinetti, Elisa Almanza, María José López, Gustavo Persak y Rafael Vera). Al personal del campo experimental N° 2 (Libertad) de la Facultad que hicieron posible que nuestro ensayo se pudiera llevar a cabo.

A su vez para no olvidarnos de nadie, agradecemos a todas aquellas personas que nos apoyaron en este trabajo.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
PAGINA DE APROBACION	II
AGRADECIMIENTOS	III
LISTA DE TABLAS Y FIGURAS	V
LISTA DE ABREVIATURAS	VI
1. RESUMEN	1
2. SUMMARY	2
3. <u>INTRODUCCION</u>	3
3.1 PRODUCCION DE PROTEINA MICROBIANA	3
3.2 PARAMETROS RUMINALES	5
3.2.1 pH ruminal	5
3.2.2 Amoníaco	7
3.3 MODULADORES RUMINALES	8
3.3.1 Levaduras	8
3.3.2 Buffers	9
4. <u>OBJETIVOS</u>	11
4.1 OBJETIVOS GENERAL	11
4.2 OBJETIVOS PARTICULARES	11
5. <u>MATERIALES Y METODOS</u>	12
5.1 ANIMALES, TRATAMIENTOS Y DIETAS	12
5.2 MEDICIONES Y CALCULOS REALIZADOS	13
5.2.1 Producción de Proteína Microbiana	13
5.2.2 Parámetros Ruminales	13
5.2.2.1 pH Ruminal	14
5.2.2.2 N-NH ₃	14
5.2.3 Composición química de la pastura	14
5.3 ANALISIS ESTADISTICO	14
6. <u>RESULTADOS</u>	15
6.1 PRODUCCION DE PROTEINA MICROBIANA	15
6.2 PARAMETROS RUMINALES	16
6.2.1 pH ruminal	16
6.2.2 Amoníaco ruminal	17

7. <u>DISCUSION</u>	21
8. <u>CONCLUSIONES</u>	25
9. <u>BIBLIOGRAFIA</u>	26

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

Página

CUADRO I. Composición química de la pastura consumida por los animales durante el diseño experimental.....	14
CUADRO II. Excreción urinaria de alantoína y Nitrógeno microbiano (Nmo) en borregos alimentados con una pastura de buena calidad.....	15
CUADRO III. Eficiencia de síntesis microbiana en borregos alimentados con forraje fresco.....	16
CUADRO IV. Valores promedios de pH y N-NH ₃ en borregos alimentados durante todo el día (TD), 6 horas/día sin aditivos (1D), o con aditivos, buffers (1D+B), o levaduras (1D+S), y 6 horas/día a pastoreo (1DP).....	16
Figura 1. Valores promedio de pH ruminal en el transcurso del día en borregos alimentados con una pastura de buena calidad.....	17
Figura 2. Concentraciones medias de amoníaco en el transcurso del día en borregos alimentados con forraje fresco.....	18
Figura 3. Valores medios de pH y de concentración de N amoniacal en el transcurso del día para los tratamientos todo el día (TD) y 6 horas/día (1D) en borregos alimentados con una pastura de buena calidad.....	19
Figura 4. Valores medios de pH y de concentración de N amoniacal en el transcurso del día para los tratamientos 6 horas/día (1D) y 6 horas/día pastoreo (1DP) en borregos alimentados con forraje fresco.....	19

LISTA DE ABREVIATURAS

aa: aminoácidos

AGV: ácidos grasos volátiles

CH: carbohidratos

DP: derivados de purinas

FAD: fibra ácido detergente

FND: fibra neutro detergente

mo: microorganismos ruminales

MO: materia orgánica

MODI: materia orgánica digestible ingerida

MODR: materia orgánica aparentemente degradada en rumen

MS: materia seca

N mo: nitrógeno microbiano

N NH₃: nitrógeno amoniacal

PM: proteína microbiana

1. RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue estudiar la producción de proteína microbiana y el ambiente ruminal (pH y amoníaco) de animales alimentados con una pastura templada de buena calidad según el tiempo de acceso a la misma y la adición o no de moduladores de la fermentación ruminal. Treinta borregos fueron distribuidos en 5 tratamientos: forraje fresco disponible todo el día (TD) o durante 6 horas/d (1D, 1D+B, 1D+S y 1DP). TD, 1D, 1D+B, 1D+S fueron alojados en jaulas metabólicas y 1DP a pastoreo. 1D+B ingirieron buffers (2% de la MS ingerida, 75% NaHCO₃-25% MgO); 1D+S levaduras (6.2 x 10⁹ UFC/d de *Saccharomyces cerevisiae*). A partir de la eliminación de alantoína urinaria diaria se estimó indirectamente la producción de nitrógeno microbiano y su eficiencia de utilización. Muestras de líquido ruminal extraídas a cada hora durante 24 horas fueron analizadas para pH y amoníaco. Los datos de producción de proteína microbiana y su eficiencia fueron analizados estadísticamente utilizando un modelo general lineal, y las medias de pH y amoníaco se compararon entre tratamientos mediante un procedimiento mixto. La producción de proteína microbiana y su eficiencia no fueron afectadas por los tratamientos. Los valores de pH ruminal fueron cercanos a la neutralidad. Y, mientras que el tiempo de acceso al alimento y la adición o no de buffers o levaduras, no afectó el ambiente ruminal, los animales a pastoreo presentaron mayores concentraciones de amoníaco que los animales en jaula.

Palabras clave: pastura templada, tiempo de acceso, ambiente ruminal, proteína microbiana.

2. SUMMARY

The aim of this work was to study the microbial protein production and the ruminal environment (pH and ammonia) of animals fed a temperate high quality pasture according to the time of access to it and the addition or not of ruminal fermentation modulators. Thirty weathers were allocated into 5 treatments groups: fresh forage available all day (AD), or during 6 hours a day (1D, 1D+B, 1D+S, 1DG). AD, 1D, 1D+B and 1D+S were allocated in metabolic cages and 1DG was grazing. 1D+B ate buffers (2% DMI, 75% NaHCO₃-25% MgO); 1D+S yeasts (6.2×10^9 UFC/d of *Saccharomyces cerevisiae*). Microbial nitrogen production and its utilization efficiency were indirectly estimated by daily urinary allantoin elimination. Data of microbial protein production and its efficiency were statistical analyzed using a general lineal model, and mean pH and ammonia values were compared between treatments using a mixed model. Microbial protein production and its efficiency were not affected by treatments. Ruminal pH values were closed to the neutrality. Whereas the time of access to food and the addition or not of buffers or yeasts did not affected the ruminal environment, grazing animals had higher ammonia concentrations than animals in cages.

Key words: temperate pasture, time of access, rumen environment, microbial protein

3. INTRODUCCION

El Uruguay presenta un relieve escasamente abrupto y elevado, en el que destacan la existencia de cuchillas, y serranías que difícilmente consiguen superar los 500 metros de altitud. Por este motivo, tradicionalmente se ha considerado como un país de praderas (Moya y Bayo, 2006).

La alimentación de los rumiantes en Uruguay se basa principalmente en la utilización de forrajes frescos a través del pastoreo directo de campo natural como soporte básico de la ganadería. La incorporación de nuevas especies y variedades forrajeras, mejoradas y adaptadas, en especial en áreas de ganadería extensiva permiten el pastoreo durante todo el año (INIA, 2009).

Trabajos realizados en Uruguay demostraron que el ambiente ruminal de animales que consumen praderas templadas es diferente al ambiente ruminal óptimo (Cajarville *et al.*, 2000). Animales alimentados en forma restringida, solamente una vez por día y durante 4 horas, presentaron una gran variación diurna del pH ruminal. Los mismos presentaron una notoria disminución del pH ruminal a partir del comienzo de la ingesta, alcanzando el mínimo valor a las 4 horas post-ingestión, y, permaneciendo en valores inferiores al óptimo durante 9 horas del día (Pérez, 2006). Mientras que, animales alimentados en forma continua, presentaron fluctuaciones del pH ruminal débiles o poco notorias durante el día (Pérez, 1997).

En el presente estudio se pretende determinar cómo es afectada la producción de proteína microbiana (PM) y los principales parámetros (concentración de nitrógeno amoniacal (N-NH₃) y pH) en el rumen de animales alimentados con forraje fresco de una pastura templada, en jaulas metabólicas o a pastoreo con diferente tiempo de acceso al mismo y suplementados o no con moduladores de la fermentación ruminal.

3.1 PRODUCCION DE PROTEINA MICROBIANA

El rumiante es capaz de convertir la proteína vegetal ingerida en proteína animal como ser carne, lana y leche (Galdámez-Cabrera *et al.*, 2003). Para cumplir con esta función, los rumiantes necesitan de un aporte de aminoácidos (aa) a los tejidos. Estos aa, que son absorbidos en el intestino delgado, son suministrados principalmente por las proteínas microbianas sintetizadas en el rumen, y por las proteínas de la dieta que escapan a la fermentación ruminal (proteína de by pass) (Astibia *et al.*, 1984).

La población microbiana ruminal es capaz de atacar, degradar y fermentar a los carbohidratos estructurales del forraje generando ácidos grasos volátiles (AGV), gases como metano y dióxido de carbono, y células microbianas (Vargas y Kolver 1997). La proteína que conforma el cuerpo de estos microorganismos es la PM.

La PM suministra la mayoría de los aa esenciales que se absorben a nivel intestinal, entre el 40 y el 100% en bovinos alimentados con forrajes (AFRC, 1992; Clark *et al.*, 1992; Akif Karsli y Russel, 1999; NRC 2001). Además, estos aa son de alta calidad debido a que los microorganismos ruminales (mo) generalmente contienen un buen perfil de aa (Clark *et al.*; 1992; Dewhurst *et al.*, 2000). Por lo tanto, la PM debe ser considerada como una fuente importante de proteína para el animal (Dewhurst *et al.*, 2000).

La síntesis de PM depende de diversos factores, entre ellos, de la cantidad de materia orgánica (MO) degradada en el rumen, la cual es afectada por el nivel de ingesta, de la digestibilidad del forraje y de la relación entre las cantidades de N y MO degradada. De esta manera, los rumiantes requieren de un equilibrio o sincronía en la disposición de N y energía (Akif Karsli y Russel, 1999).

Si existe asincronía entre el suministro de energía y N a los mo, por ejemplo, ante un escaso aporte energético de la dieta (Russell, 1998), la utilización de N por los mo y la producción de PM son suprimidas (Hristov *et al.*, 1997). Ese N, que está principalmente representado por el N-NH₃, constituye una pérdida, ya que se absorbe en el rumen y es parcialmente excretado como urea (Kozloski *et al.*, 2009).

La medida en que el N-NH₃ se utiliza en el rumen depende principalmente de la tasa de liberación y del balance de los carbohidratos (CH) y de la disponibilidad de N (Hristov *et al.*, 2005).

Una de las maneras de evitar la asincronicidad, entre el aporte de N y energía de la dieta es aumentar la frecuencia de alimentación de los animales (Kozloski *et al.*, 2009), ya que está aumentaría la disponibilidad de N y energía en diferentes momentos del día.

La eficiencia microbiana es definida como los gramos de nitrógeno microbiano (N mo) que pasan por el duodeno por kilogramo de MO verdaderamente degradada en rumen (Clark *et al.*, 1992). El AFRC (1992) adoptó un valor promedio de 30 g N mo/kg MO aparentemente degradada en rumen (MODR), pero en la bibliografía se encuentra un amplio rango de valores.

Un correcto equilibrio entre la disponibilidad de N y la liberación de energía en el rumen, aumenta la eficiencia de síntesis de PM y la tasa de crecimiento de los animales (Lee *et al.*, 2002).

Por lo tanto, la disponibilidad de CH para la fermentación ruminal es un factor clave para mejorar la eficiencia de utilización del N de la dieta de los rumiantes (Hristov *et al.*, 2005).

Por otra parte, y debido a la importancia que tiene la PM, es relevante cuantificar el flujo de N mo que llega al duodeno de los animales (Akif Karsli y

Russel, 1999), con el fin de corregir la dieta de los mismos y mejorar el uso tanto del N del forraje como de la fuente de proteína (Dewhurst *et al.*, 2000).

Actualmente para la estimación del flujo de N no se trata de utilizar animales intactos. La preocupación por el uso y bienestar de animales preparados quirúrgicamente para la investigación, ha estimulado la búsqueda de técnicas alternas.

Para la estimación del aporte de N no se utilizan diversas técnicas basadas en el uso de marcadores internos (ácido diaminopimelico, ácidos nucleicos, purinas y pirimidinas) y externos (Sandoval y Herrera 1999).

En los rumiantes hipoxantina, xantina, ácido úrico y alantoína, son el producto final del catabolismo de las purinas, a las cuales se les denomina derivados de purina: (DP). Los DP excretados en orina pueden provenir de tres fuentes, de los mo, de las purinas de la dieta o de las purinas de origen endógeno. Esta última fuente es el resultado del recambio tisular de los animales. En rumiantes los DP parecen provenir principalmente de ácidos nucleicos de los mo que fluyen y son digeridos y absorbidos a nivel duodenal. La determinación de los DP excretados en orina representa una alternativa simple y no invasiva para la estimación de la síntesis de N mo en rumen. En animales a pastoreo y/o con un bajo nivel de suplementación, la contribución de purinas de la dieta es mínima, debido a que estos alimentos se degradan casi exclusivamente en rumen. (Sandoval y Herrera 1999).

Algunos autores sugieren que la medición única de alantoína es suficiente para estimar la síntesis de N mo, dada la poca variación encontrada entre las proporciones de alantoína: ácido úrico: xantina-hipoxantina (Chen *et al.*, 1990; Balcells *et al.*, 1991; Puchala y Kulasek 1992).

3.2 PARAMETROS RUMINALES

3.2.1 pH ruminal

El pH ruminal es uno de los principales parámetros ruminales que afectan directamente al crecimiento microbiano y, en consecuencia, a la fermentación ruminal. Además el pH ruminal se relaciona con el tipo de mo que crecerá a nivel ruminal (Pereira *et al.*, 2007).

Cuando los rumiantes ingieren forrajes, la flora microbiana ruminal es principalmente celulolítica. Si bien la mayoría de los microorganismos ruminales están adaptados a desarrollarse en un pH que varía de 5,5 a 7,0 el valor óptimo de pH para la flora celulolítica es cercano a la neutralidad (Pereira *et al.*, 2007). Según Van Soest (1994), el pH ruminal de los animales a pastoreo, como único alimento, se encuentra cercano al óptimo para la actividad celulolítica ($6,7 \pm 0,5$).

Los rumiantes poseen un sistema altamente desarrollado para mantener el pH ruminal dentro de un rango fisiológico (Krause y Oetzel 2006). En el retículo-rumen el pH es producto de la interacción entre la producción y absorción de

AGV, la producción de saliva, el nivel de ingesta de alimento y el intercambio de bicarbonato en el rumen a través de epitelio ruminal (Wheeler 1980).

La absorción de AGV a nivel ruminal se produce pasivamente a través de la pared (Bergman, 1990). Esta absorción es favorecida por las papilas que proporcionan una gran superficie de contacto (Krause y Oetzel, 2006).

La gran cantidad de saliva producida diariamente por el rumiante (10 litros en el ovino, McDonald, 2006) es rica en sodio, potasio, bicarbonato y fosfatos (Van Soest, 1994), y contribuye aproximadamente a la mitad del bicarbonato que entra en el rumen actuando como buffer (Owens *et al.*, 1998).

El flujo y la cantidad de saliva, o sustancias buffer, que entran en el retículo-rumen dependen de diversos factores como, la ingesta, la rumia, y el contenido de MS y nutrientes del alimento ingerido (Wheeler 1980).

El aumento en la ingesta de nutrientes mediante la adición de concentrados en la dieta da lugar a una mayor digestibilidad aparente total de MS, MO y PB. (Pereira *et al.*, 2007). Pero la inclusión de altos niveles de granos en la dieta puede producir varias patologías que se asocian principalmente con una mayor producción de AGV en el rumen con lo que el pH disminuye (Wheeler 1980).

En los últimos tiempos, debido a las presiones económicas, se ha puesto énfasis en la alimentación del rumiante con grandes cantidades de grano para aumentar la productividad. Por lo tanto, es frecuente la aparición de patologías como ser la acidosis ruminal. La acidosis ruminal subaguda (SARA) se define como periodos de pH ruminal moderadamente bajos, de alrededor de 5.5 a 5.0 (Krause y Oetzel 2006).

El bajo pH tiene un impacto negativo en la integridad de la pared ruminal (Thompson *et al.*, 2006). Reiteradas agresiones pueden causar atrofia papilar y difusas áreas de lesiones agudas o crónicas. Las cicatrices, derivadas de graves ruminitis, y perforaciones de la mucosa ruminal causan dolor, alteración de la función ruminal e irregularidad en el consumo de los animales (Thompson *et al.*, 2006). Un estado de acidosis puede estar asociado además con laminitis y otras patologías que resultan en la disminución de la producción animal (Krause y Oetzel 2006).

Una alta frecuencia de la alimentación reduce la variación del pH ruminal posterior a la alimentación (Castro *et al.*, 2002), pero puede conducir a un aumento de la ingesta de MS, que en última instancia, se traducirá en una disminución del pH ruminal (Oetzel y Nordlund, 1998). Aunque, generalmente, en esta situación la capacidad del rumen para absorber rápidamente los AGV, estabiliza rápidamente al pH ruminal (Krause y Oetzel, 2006).

Por el contrario, una baja frecuencia alimentaria genera una disminución del pH ruminal posterior a la alimentación que puede persistir durante varias horas del día (Cajarville *et al.*, 2006; Pérez, 2006).

Un pH reducido no causa necesariamente la muerte de las bacterias, sino que puede reducir transitoriamente su actividad y crecimiento (Cerrato *et al.*, 2005). Los efectos negativos van a depender del tiempo total en el que el pH se encuentra por debajo del óptimo. Períodos prolongados (12 horas) a pH subóptimos afectan la fermentación ruminal (Cerrato *et al.*, 2005).

Un bajo pH ruminal puede provocar la reducción del número de mo celulolíticos (Stewart, 1977) y una reducción de la colonización de las partículas por los mismos (Huhtanen y Khalili, 1990). No obstante, Kozloski *et al.* (2007), trabajando con forrajes *in vitro* observaron que la colonización de los microorganismos a los forrajes no es afectada por el pH, aunque si la magnitud de la degradación.

3.2.2 Amoníaco

La degradación de proteínas, aa, y otros compuestos nitrogenados produce N-NH₃ en el rumen. La mayoría de las bacterias ruminales pueden utilizar N-NH₃ como fuente de N (Russell, 1996). La concentración de N-NH₃ es esencial para el crecimiento microbiano, principalmente para las bacterias celulolíticas (Van Soest *et al.*, 1994).

La concentración de N-NH₃ en el rumen puede variar considerablemente dependiendo de la dieta y del tiempo y la frecuencia de alimentación de los animales, entre otros factores (Hristov *et al.*, 2005).

Si bien la administración de suplementos, en general, aumenta la concentración de N-NH₃ (Mould *et al.*, 1983), tanto el nivel de ingesta como la frecuencia de alimentación no afectarían sus concentraciones (Pereira *et al.*, 2007, Kozloski *et al.*, 2009).

Una concentración de N-NH₃ de 5 mg/dl es considerada como el nivel mínimo necesario para el uso eficiente de los CH para el crecimiento microbiano (Pereira *et al.*, 2007).

Cuando los rumiantes consumen pasturas de buena calidad, las concentraciones de N-NH₃ ruminal varían entre niveles de 6 a 30mg/dl (Nápoli y Santini, 1988; Khalili y Sairanen, 2000).

En general, la concentración de N-NH₃ aumenta durante la comida y alcanza un nivel máximo al final de la misma. La absorción de N-NH₃ es influenciada por la concentración de N-NH₃ en el líquido ruminal y por el ritmo de absorción de los AGV (Remond *et al.*, 1993).

La absorción de N como N-NH₃ representaría una importante pérdida potencial de eficiencia productiva, porque, a fin de evitar la toxicidad de este N-NH₃, se debe detoxificar a urea en el hígado (Symonds *et al.*, 1981). Esto sería una grave pérdida neta para el animal, si no fuera por la existencia del mecanismo de rescate de la urea. La ureagénesis hepática es de vital importancia para los

rumiantes para evitar la intoxicación por N-NH₃ absorbido (Lapierre *et al.*, 2005). En las dietas comúnmente proporcionadas a las vacas lecheras, la capacidad del hígado para extraer el N-NH₃ no se supera. De acuerdo con las observaciones de Symonds *et al.* (1981), esta capacidad del hígado es máxima cuando se absorben alrededor de 900 mmol / h.

3.3 MODULADORES RUMINALES

3.3.1 Levaduras

En los últimos tiempos los trabajos de investigación se han enfocado en mejorar el funcionamiento del rumen con el fin de reducir las pérdidas de energía y de nutrientes para aumentar la eficiencia de producción de los rumiantes domésticos.

La inclusión de probióticos en los alimentos tiene como finalidad estimular ciertas cepas de bacterias del tubo digestivo a expensas de las menos deseables. Los probióticos son microorganismos vivos, que suplementados con la dieta, benefician a los animales hospedadores mejorando el equilibrio microbiano del tubo digestivo (Mc Donald *et al.*, 2006).

Entre las distintas alternativas de probióticos, las levaduras, y principalmente las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* (Sc), han sido las más estudiadas y utilizadas en la alimentación de los rumiantes (Guedes *et al.*, 2008).

Unos de los principales mecanismos de acción de Sc es la capacidad de consumo de oxígeno en el ambiente ruminal. Mejorando la anaerobiosis y por ende el crecimiento de la flora ruminal.

Las diferentes cepas de Sc presentan una capacidad diferente de consumo de oxígeno. La concentración de oxígeno en el rumen puede bajar a cero, según la cepa y dosis de levadura administrada y el tiempo transcurrido luego de la ingesta. El factor más importante para determinar si una cepa es buena o no, es la capacidad de consumo de oxígeno. En cuanto a la dosis de levadura, una dosis de 0,3 g / l, puede disminuir la concentración de oxígeno en el rumen por debajo de 0,001 mg / l en menos de 50 minutos. (Brydl *et al.*, 2005).

En la producción ganadera la utilización de productos de levadura seca activa a tenido efectos beneficiosos en los rumiantes (Chaucheyras-Durand *et al.*, 2008). Estos efectos varían de acuerdo a factores bióticos de las levaduras, tales como el tipo de cepa y su viabilidad, y también según factores abióticos, tales como la naturaleza de la dieta o el estado fisiológico de los animales (Chaucheyras-Durand *et al.*, 2008).

La administración de levaduras vivas o activas en la dieta de rumiantes genera beneficios asociados como ser, el aumento de la digestión de MS y de la fibra

neutro detergente (FND) (Carro *et al.*, 1992), el aumento de las tasas iniciales de digestión de la fibra (Williams y Newbold, 1990), y la reducción de la acumulación ruminal de ácido láctico (Erasmus *et al.*, 2005). El ácido láctico es un ácido orgánico, más fuerte que los AGV, producido principalmente por el *Streptococcus bovis*, y es el responsable de las acidosis agudas (Radostits *et al.*, 2002).

Williams *et al.* (1991) reportaron un aumento en el pH ruminal del ganado lechero adulto suplementado con levaduras. Dicho aumento se atribuyó a la reducción de la concentración de lactato-L ruminal. Al respecto, algunos autores sugieren que el cultivo de levadura proporciona factores de crecimiento para la utilización del lactato, reduciendo así la concentración del mismo (Quigley *et al.*, 1992). Por lo tanto, la suplementación con levaduras puede mejorar la utilización del lactato a nivel ruminal, en determinadas condiciones (Krause y Oetzel 2006). En trabajos realizados *in vitro*, se ha demostrado que una cepa de Sc es capaz de superar a *Streptococcus bovis* a la hora de competir por la utilización de azúcares. Por lo tanto, Sc limita la cantidad de lactato producido por esta especie bacteriana (Chaucheyras-Durand *et al.*, 2008).

Hasta ahora, los efectos positivos más consistentes de las levaduras secas activas han sido evidenciados en la actividad microbiana ruminal de los terneros, la estabilización del pH ruminal y la prevención de la acidosis, así como la estimulación de crecimiento y la actividad de las bacterias celulolíticas (Chaucheyras-Durand *et al.*, 2008). Según Lesmeister *et al.* (2004), sus efectos podrían estar relacionados con un mayor desarrollo ruminal, en cuanto a la longitud y anchura de las papilas y al grosor de la pared ruminal.

3.3.2 Buffers

Durante muchos años, la investigación en nutrición de rumiantes se ha dedicado a estudiar el efecto de las sustancias buffer en el retículo rumen (Wheeler, 1980).

Los buffers son incluidos en la dieta del rumiante para mantener el pH del rumen en niveles que favorezcan la actividad de los microorganismos celulolíticos. Compuestos químicos como el bicarbonato sódico, carbonato sódico, carbonato cálcico y óxido de magnesio tamponan los hidrogeniones y aumentan la dilución del líquido ruminal (Mc Donald *et al.*, 2006).

El más común de los buffers utilizados en la alimentación del rumiante, es el bicarbonato de sodio (NaHCO_3) de naturaleza no nutritiva que deriva de la soda y posee un pH de 8.4 (Gómez, 2003).

Si el pH ruminal disminuye por debajo de los niveles considerados como óptimos, se puede justificar la utilización de buffers. Éstos regulan el pH,

aumentan el consumo, la digestión del alimento y la cantidad de leche producida y el porcentaje de grasa de la misma (Gómez, 2003; Krause y Oetzel 2006).

Entre los investigadores, existen contradicciones acerca de los efectos de las sustancias buffer en los rumiantes (Wheeler 1980).

Si bien algunos estudios han demostrado respuestas beneficiosas a la adición de buffers, otros o bien no manifiestan una respuesta, o incluso presentan una reducción en el desempeño de los animales (Wheeler, 1980).

Santra *et al.* (2003), evaluando la inclusión de distintas proporciones NaHCO₃ en la dieta, observaron que el mismo aumenta la digestibilidad de la celulosa, el número de protozoarios ciliados, el pH ruminal y la concentración total de N, resultando en un mayor crecimiento de los corderos mantenidos con una dieta altamente concentrada.

Según distintos autores, el adicionar bicarbonato de sodio en dietas altamente concentradas no solo mejora la digestibilidad de nutrientes (Erdman *et al.*, 1982; Rogers *et al.* 1985; James y Wohlt; 1985) sino también la síntesis de PM (Santra *et al.*, 2003).

De todas maneras, el empleo de sustancias buffers, es frecuente cuando se alimenta a los rumiantes con dietas ricas en concentrados, y no así en dietas netamente pastoriles.

Hipótesis:

- Cuando los animales consumen pasturas de buena calidad, con horarios restringidos, ocurriría una disminución del pH ruminal por debajo de los valores óptimos para la fermentación ruminal.
- Esta bajada de pH perjudicaría el aprovechamiento de la dieta, y provocaría una disminución en la producción de PM.
- Los moduladores ruminales amortiguarían la caída del pH, y por lo tanto mejorarían la producción de PM y la utilización de N-NH₃ por los mo.
- La forma de acceso al alimento no afectaría los parámetros ruminales.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Estudiar la producción de proteína microbiana y el ambiente ruminal de ovinos alimentados con una pastura templada de buena calidad según el tiempo y forma de acceso a la misma y la adición o no de moduladores de la fermentación ruminal.

4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Estudiar si el tiempo de acceso a pasturas templadas de buena calidad y la adición de buffers o de levaduras afecta el ambiente ruminal y la síntesis de proteína microbiana de los animales que los consumen.
- Evaluar las diferencias existentes entre distintos compuestos utilizados como moduladores de la fermentación ruminal sobre el ambiente ruminal y la síntesis de proteína microbiana en rumen.
- Evaluar si existen diferencias en el ambiente ruminal, entre animales a pastoreo y en jaulas metabólicas.

5. MATERIALES Y METODOS

El experimento se realizó en el Campo Experimental de Libertad (34°S y 55°O), departamento de San José en otoño de 2008, y en el Departamento de Nutrición Animal, de la Facultad de Veterinaria (Montevideo, Uruguay).

5.1 ANIMALES, TRATAMIENTOS Y DIETAS

El diseño experimental se llevó a cabo en el Campo Experimental, en condiciones totalmente controladas. Se seleccionó una parcela de pradera mezcla de leguminosas y gramíneas, en estado vegetativo (80% leguminosas, principalmente *Lotus corniculatus*, en base seca), con una disponibilidad de 2065 kg de MS/hectárea. Se trabajó con 30 borregos Corriedale x Milkschaf (47.9 + 6.4 kg de peso vivo) fistulizados en el rumen. Los borregos consumieron como único alimento forraje fresco de la pradera, cortada a 5 cm del suelo o pastoreada. Fueron agrupados en bloques según su peso vivo y distribuidos al azar en 5 grupos a fin de evaluar 5 tratamientos:

- Tratamiento 1: pradera suministrada durante todo el día (TD)
- Tratamiento 2: pradera suministrada durante 6 horas/día (1D)
- Tratamiento 3: pradera suministrada durante 6 horas/día + buffer(1D+B)
- Tratamiento 4: pradera suministrada durante 6 horas/día + levaduras (1D+S)
- Tratamiento 5: pastoreo de pradera durante 6 horas/día (1DP)

Los animales de los tratamientos TD, 1D, 1D+B y 1D+S, fueron alojados en jaulas metabólicas individuales, con libre acceso al agua. Se les ofreció forraje *ad-libitum* durante el tiempo establecido para cada tratamiento (todo el día o 6 horas por día). El suplemento buffer, que consistió en una mezcla de NaHCO₃ (75%) y de MgO (25%), se suministró vía oral, al comienzo de cada comida, y representó el 2% de la MS total ingerida. Las levaduras (Sc) se suministraron a razón de $6.2 \cdot 10^9$ UFC/animal/día. El forraje fue cortado a la misma hora todos los días (7:00 AM), ofreciéndose a los animales a las 8:00 AM (tratamientos TD, 1D, 1D+B y 1D+S). Los animales del tratamiento 1DP fueron llevados a pastorear en la misma parcela utilizada para el corte, atados a una estaca con una soga de un metro y medio de longitud durante 6 horas, a partir de las 8:00 AM.

5.2 MEDICIONES Y CALCULOS REALIZADOS

Todas las mediciones se realizaron luego de un período de 21 días de adaptación de los animales a las condiciones experimentales. En los animales del tratamiento 1DP se midió pH y N-NH₃. Y en el resto de los tratamientos además de estos parámetros se midió la producción de PM.

5.2.1 Producción de Proteína Microbiana

La producción de PM a nivel ruminal fue cuantificada indirectamente por la determinación de nitrógeno de alantoína excretado en orina. La orina fue colectada a partir de 6 animales de los tratamientos TD, 1D, 1D+B y 1D+S diariamente durante 5 días. Las muestras de orina (30 ml) fueron congeladas, con ácido sulfúrico al 10% como conservante, 100 ml del mismo, se colocaban en los recipientes de colecta diaria. A partir de estas muestras se cuantificó el N de alantoína excretado, de acuerdo con el método de Young y Conway (1942), modificado por Fujihara *et al.* (1987), y la producción de PM fue estimada de acuerdo a la fórmula propuesta por Puchala y Kulasek (1992):

$$y = e^{(0.430+2.089x)}$$

donde “y” representa el N mo (g/d) que llega al duodeno y “x” la excreción urinaria de N de alantoína (g/d).

La eficiencia de producción de PM en el rumen, fue expresada como: g de N mo por kg de MS digerida, g de N mo por kg de MO digerida y como g de N mo por kg de MODR que se consideró como el 65% de la MODI, que es la MO digestible ingerida. Para obtener los valores de MS y MO digerida fue necesario medir el consumo y la excreción de heces diaria durante 5 días. El consumo de cada animal fue determinado por diferencia entre la MS ofrecida y la rechazada. El mismo fue expresado como MS ingerida (g/día), obtenida a partir de: MS ofrecida (g) – MS rechazada (g), y como MO ingerida (g/día), obtenida a partir de: MO ofrecida (g) – MO rechazada (g). A partir de alícuotas diarias de heces almacenadas se determinó la MS digerida (kg) como: MS ingerida (kg) – MS heces (kg), y la MO digerida (kg) como: MO ingerida (kg) – MO heces (kg). A partir de los gramos de N mo obtenidos se multiplicó este valor por el factor 6,25 para obtener el valor de PM producida diariamente.

5.2.2 Parámetros Ruminales

Se estudió la evolución del pH y de la concentración de N-NH₃ en el rumen, a cada hora durante 24 horas. Para ello se utilizaron 4 animales, de cada uno de

los 5 tratamientos, provistos de dispositivos permanentes de extracción de líquido ruminal.

5.2.2.1 pH Ruminal

El pH ruminal de cada muestra fue medido en forma inmediata a su extracción, utilizando un pHmetro digital.

5.2.2.2 N-NH₃

Para la determinación de la concentración de N-NH₃ se congeló una alícuota (10 ml) de líquido ruminal extraído, por hora y animal, utilizando cloruro de sodio al 20% (10ml) como conservante. Posteriormente se determinó, en el laboratorio, la concentración de N-NH₃ mediante destilación directa de la muestra.

5.2.3 Composición química de la pastura

Se realizaron análisis de composición química de la pastura (Cuadro I), que fue ofrecida a los animales, determinándose los contenidos en MS, MO y PB (N x 6.25), según A.O.A.C (1984). Se determinó el contenido de FND y FAD, de acuerdo con la técnica descrita por Goering y Van Soest (1970), modificada por Robertson y Van Soest (1981). Todas las muestras fueron analizadas por duplicado, aceptando coeficientes de variación entre análisis del 3 al 5 % según el parámetro.

Cuadro I. Composición química de la pastura consumida por los animales durante el diseño experimental

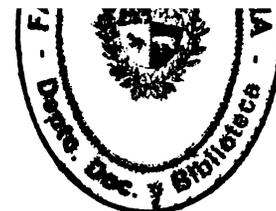
Disponibilidad inicial, kgMS/há	MS, %	MO, %*	FND, %*	FAD, %*	PB, %*
2065	29.8	88.6	44.4	28.5	12.8

* datos expresados en base seca.

5.3 ANALISIS ESTADISTICO

El diseño experimental consistió en la utilización de bloques completamente al azar, según el peso vivo de los animales. Con respecto a los análisis estadísticos de los resultados de producción de PM y su eficiencia fueron comparados entre tratamientos utilizando el modelo general lineal (GLM) del SAS, considerando los efectos tratamiento y bloque. El efecto tratamiento se analizó por medio de contrastes ortogonales del SAS, considerando los efectos: TAA, aditivo o no y tipo de aditivo. Las medias de pH y N-NH₃ se compararon entre tratamientos mediante un procedimiento mixto del SAS, considerando los efectos del tratamiento, hora y la interacción entre ambos. Se aceptaron como diferencias significativa valores de $P \leq 0,05$ y como tendencia valores de P mayores a 0,05 y menores a 0,1.

6. RESULTADOS



6.1 PRODUCCION DE PROTEINA MICROBIANA

Cuadro II. Excreción urinaria de alantoína diaria y producción de nitrógeno microbiano (Nmo) que llega al duodeno en borregos alimentados con una pastura de buena calidad

	n	Excreción urinaria	Producción de Nmo			
		Alantoína (g/día)	Nmo (g/día)	Nmo (g/kgMSing)	Nmo (g/kgMOing)	
Tratamientos	TD	6	1,18	6,83	5,34	6,11
	1D	6	0,69	4,45	5,46	6,21
	1D+B	6	0,95	5,54	5,83	6,73
	1D+S	6	0,65	4,29	5,02	5,68
ESM			0,182	0,944	0,689	0,792
P			ns	ns	ns	ns
Contrastes	TD vs 1D		0,066	0,076	ns	ns
	1Dvs(1D+B)+(1D+S)		ns	ns	ns	ns
	1D+B vs 1D+S		ns	ns	ns	ns

TD: borregos alimentados todo el día, 1D: alimentados 6 horas/día, 1D+B: 6 horas/día + buffer, 1D+S: 6 horas/día + levaduras, g/d: gramos por día, Nmo(g/kgMSing): gramos de Nmo por kilogramo de MS ingerida, Nmo(g/kgMOing): gramos de Nmo por kilogramo de MO ingerida, ESM: error estándar de las medias, P: probabilidad estadística, ns: no significativo ($P > 0.05$).

En relación a la excreción urinaria diaria de alantoína y Nmo/día (Cuadro II), si bien la comparación entre los tratamientos TD y 1D presentó una tendencia ($P=0,066$ y $0,076$ respectivamente), no se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos; al igual que cuando se relacionó la cantidad de Nmo producido con la ingesta de MS y MO, expresados como g Nmo/kgMSing y g Nmo/kgMOing.

Cuadro III. Eficiencia de síntesis microbiana en borregos alimentados con forraje fresco

		Eficiencia de Síntesis mo			
		n	g Nmo/kgMSdig	g Nmo/kgMODig	g Nmo/kgMODR
Tratamientos	TD	6	8,42	9,09	14,0
	1D	6	8,96	9,82	15,1
	1D+B	6	9,99	10,7	16,5
	1D+S	6	7,57	8,18	12,6
ESM			1,244	1,240	1,908
P			ns	ns	ns
Contrastes TD vs 1D			ns	ns	ns
Contrastes	1D vs (1D+B)+(1D+S)		ns	ns	ns
	1D+B vs 1D+S		ns	ns	ns

TD: borregos alimentados todo el día, 1D: alimentados 6 horas/día, 1D+B: 6 horas/día + buffer, 1D+S: 6 horas/día + levaduras, g/d: gramos por día, Nmo(g/kgMSdig): gramos de Nmo por kilogramo de MS digerida, Nmo(g/kgMODig): gramos de Nmo por kilogramo de MO digerida, gNmo/kgMODR: gramos de Nmo por kilogramo de MO aparentemente degradada en rumen, ESM: error estándar de las medias, P: probabilidad estadística, ns: no significativo (P>0.05), n: animales por tratamiento.

En cuanto a la eficiencia de síntesis microbiana, expresada como gNmo por kg de MS o MO digerida y como gNmo por kg de MODR (Cuadro III), no se encontraron diferencias entre tratamientos. El valor promedio de gNmo/kgMODR obtenido fue de 14,6.

6.2 PARAMETROS RUMINALES

6.2.1 pH ruminal

En la Cuadro IV se esquematizan los valores promedio de pH y de N-NH₃ para cada tratamiento.

Cuadro IV. Valores promedios de pH y N-NH₃ en borregos alimentados durante todo el día (TD), 6 horas/día sin aditivos (1D), o con aditivos buffers (1D+B), o levaduras (1D+S), y 6 horas/día a pastoreo (1DP)

	n	TD	1D	1D+B	1D+S	1DP	ESM	t	h	t x h
pH	4	6,65 ^a	6,64 ^a	6,89 ^b	6,82 ^b	6,62 ^a	0,035	< 0,001	< 0,001	ns
N-NH ₃	4	23,0 ^a	23,5 ^a	21,4 ^a	24,4 ^a	30,1 ^b	0,840	< 0,001	< 0,001	ns

ESM: error estándar de las medias, ns: no significativo (P>0.05), t: efecto entre tratamientos, h: efecto hora, txh: interacción entre t y h, * n= número de animales por tratamiento.

En relación al pH, se encontraron diferencias significativas entre tratamientos y entre horas a partir de la ingestión.

Los valores de pH ruminal fueron cercanos a la neutralidad. Aunque, los animales del tratamiento 1DP presentaron el promedio más bajo.

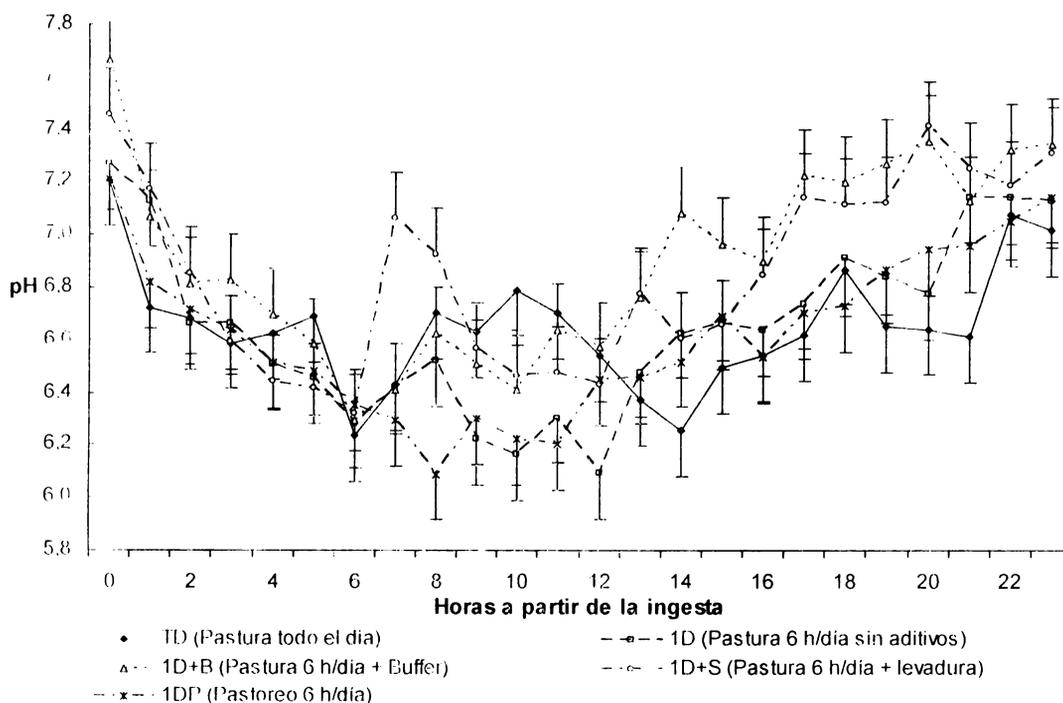


Figura 1. Valores promedio de pH ruminal en el transcurso del día en borregos alimentados con una pastura de buena calidad

En la Figura 1, se visualizan la evolución del pH ruminal en 24 horas para cada tratamiento. En la misma se puede observar que inmediatamente de la hora 0 (hora en la cual se empezó a suministrar el alimento), se produce una disminución progresiva del pH ruminal hasta la hora 6 a 12, en que se registraron los mínimos valores (TD: 6,23; 1D: 6,09; 1D+B: 6,29; 1D+S: 6,32; 1DP: 6,09). Luego el pH comenzó a aumentar progresivamente hasta alcanzar los valores iniciales.

6.2.2 Amoniaco ruminal

En cuanto a las concentraciones de N-NH₃, éstas fueron superiores a 20 mg/dl para todos los tratamientos (Tabla IV). Los animales alimentados una vez por día a pastoreo presentaron una mayor concentración de N-NH₃ en promedio (P<0.001), con respecto a el resto de los tratamientos.

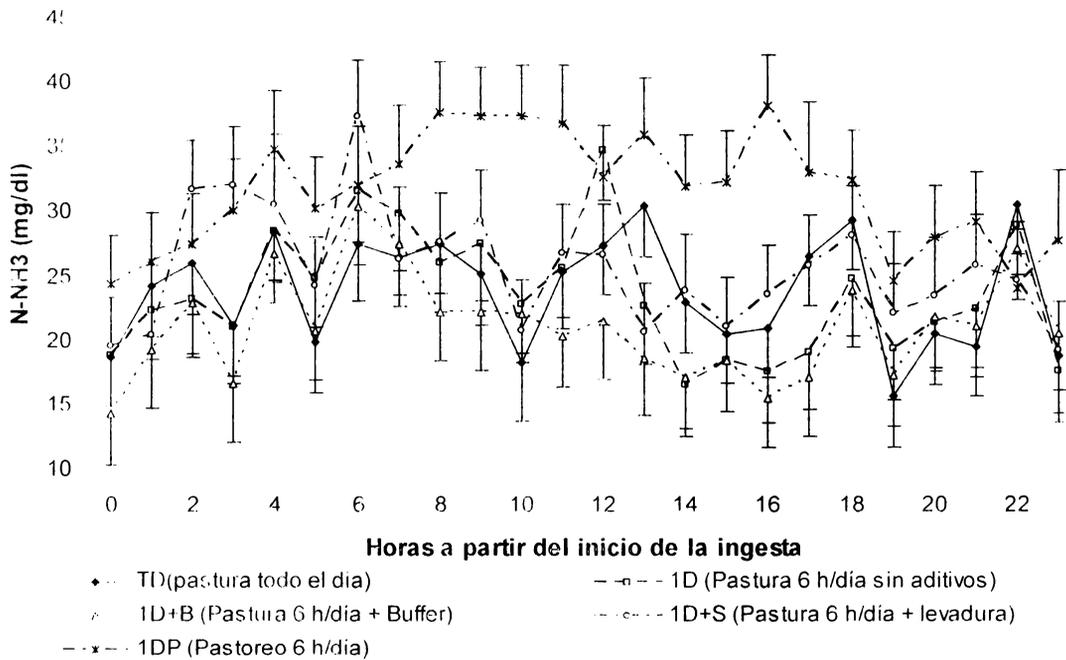


Figura 2. Concentraciones medias de amoniaco en el transcurso del día en borregos alimentados con forraje fresco

En la Figura 2 se representa la variación diurna de las concentraciones de N-NH₃ durante 24 horas para cada tratamiento. En esta figura se observa que a partir del inicio de la ingesta las concentraciones de N-NH₃ aumentaron progresivamente hasta alcanzar los valores máximos (TD: 30,51; 1D: 34,79; 1D+B: 30,45; 1D+S: 37,33; 1DP: 38,16) entre las horas 6 y las 22.

En las Figuras 3 y 4 se puede observar que, cuando se registraron los valores mínimos de pH, las concentraciones de N-NH₃ en rumen fueron máximas.

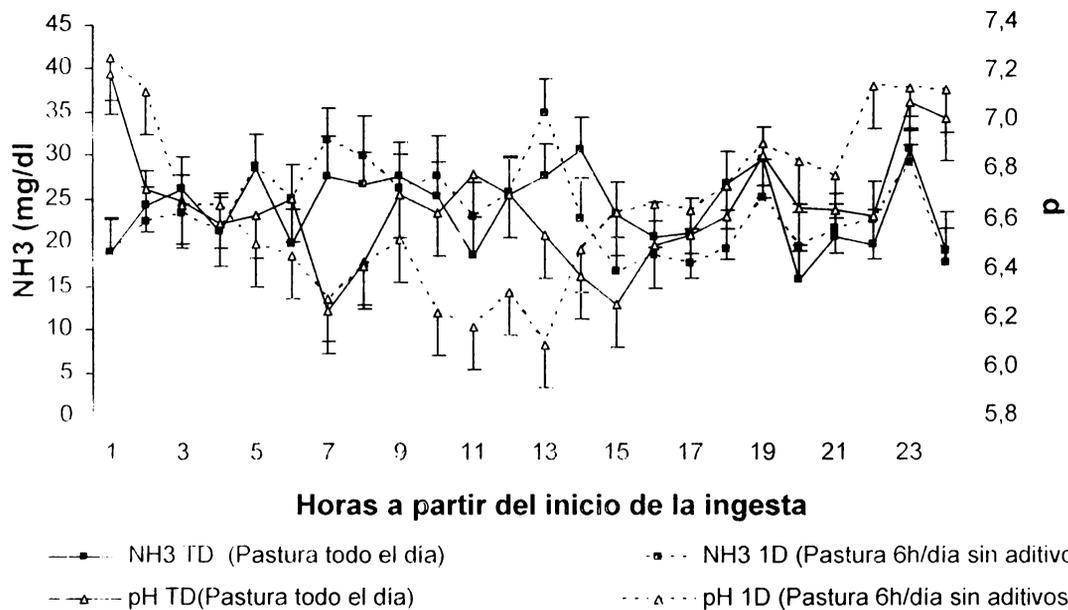


Figura 3. Valores medios de pH y de concentración de N amoniacal en el transcurso del día para los tratamientos todo el día (TD) y 6 horas/día (1D) en borregos alimentados con una pastura de buena calidad

Cuando se compararon solamente los tratamientos TD y 1D no se encontraron diferencias significativas para el pH ruminal, ni para las concentraciones de N-NH₃.

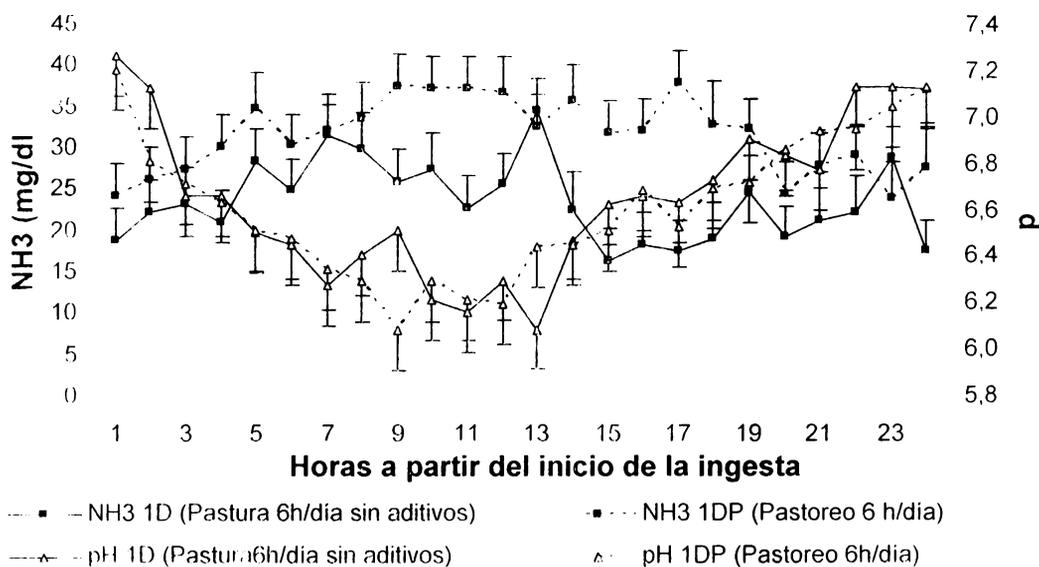


Figura 4. Valores medios de pH y de concentración de N amoniacal en el transcurso del día para los tratamientos 6 horas/día (1D) y 6 horas/día pastoreo (1DP) en borregos alimentados con forraje fresco

Cuando se compararon los valores medios de pH y N-NH₃ ruminal para los tratamientos 1D y 1DP (Figura 4), tampoco se encontraron diferencias en el pH ruminal, pero sí se registraron diferencias significativas en las concentraciones de N-NH₃. El tratamiento 1DP presentó mayores concentraciones que el tratamiento 1D (P<0,001).

7. DISCUSION

En el presente trabajo no se observaron diferencias en la síntesis de PM entre los diferentes tratamientos, a pesar de que se esperaba que fuera mayor para los animales alimentados durante todo el día en relación a los animales del tratamiento control. No obstante, los animales del tratamiento TD tendieron a producir mayores cantidades de N mo que los de 1D ($P=0.076$). Ésto reflejaría una influencia del tiempo de acceso al alimento sobre la producción de PM.

Con respecto a la eficiencia de síntesis de PM, no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos. Por lo tanto, en las condiciones en que se realizó este experimento, ni el acceso al alimento durante todo el día ni el uso de aditivos (buffer o Sc), generan efectos benéficos en la eficiencia de síntesis microbiana.

En relación al valor promedio obtenido para la eficiencia de síntesis microbiana fue de 14,6 gNmo/kgMODR, lo que equivale a un valor de 91,25 g de PM/kgMODR. Dicho valor se encuentra por debajo del obtenido, en un trabajo realizado en Uruguay con ovinos alimentados con un forraje de una pastura templada de buena calidad, en el cual el valor medio obtenido fue de 120 g de PM/kgDOMR (Pérez, 2006). Otros autores, en novillos alimentados con hierba, informaron que se producían alrededor de 150 g de PM/kgDOMR (Tamminga *et al.*, 1988; Brun-Bellut *et al.*, 1990) o unos 187,5 g de PM/kgDOMR (AFRC, 1992).

Una menor eficiencia en la síntesis de PM, puede deberse a una baja concentración de N-NH₃, o de energía disponible, a la asincronía de ambos, o a factores que alteren el ambiente ruminal como ser un bajo pH. Hristov *et al* (2005), demostraron que el suministro de energía fácilmente fermentable en rumen puede aumentar la síntesis de PM. Mientras que, Trevaskis *et al.* (2001), en un estudio realizado con ovinos observaron que la síntesis de PM fue beneficiada mediante la sincronización en la disponibilidad de CH rápidamente fermentescibles con el N-NH₃ en rumen. La reducción en el pH ruminal, hacia valores de 5,5 puede disminuir la síntesis de PM (Hoover y Stokes, 1991).

Las concentraciones de N-NH₃ en nuestro experimento no serían la limitante para la síntesis de PM, debido a que éstas fueron altas durante todo el día. El pH ruminal no sería el responsable de la baja eficiencia de síntesis microbiana debido a que sus valores promedio fueron cercanos a la neutralidad en todas las horas y para todos los tratamientos. Por lo tanto, nos inclinamos a pensar que la menor eficiencia microbiana detectada en este experimento, en comparación con la bibliografía, podría deberse a la insuficiencia de energía fácilmente fermentescible en el rumen ó a la asincronía de su disponibilidad con la del N.

Los valores de pH ruminal registrados, en general se mantuvieron dentro del óptimo de $6,7 \pm 0,5$ propuesto por Van Soest (1994). El valor medio obtenido entre todos los tratamientos fue de 6,7. Este valor coincide con los reportados en diferentes trabajos realizados con rumiantes en pastoreo (Abarca *et al.*, 1999; Cajarville *et al.*, 2000).

En este trabajo se esperaba encontrar una caída del pH ruminal más importante y valores promedio más bajos en los animales alimentados por un periodo de tiempo restringido, tal como se observó en el trabajo de Pérez (2006). En este último, a pesar de que las condiciones fueron similares a las de este ensayo, la pastura administrada a los animales estaba constituida principalmente por gramíneas. Es importante resaltar que la capacidad buffer de las leguminosas es mayor que la encontrada en las gramíneas (Van Soest, 1994)

No obstante, Abarca *et al.* (1999), observaron que el pH del rumen no disminuyó cuando los animales fueron alimentados durante todo el día con leguminosas-gramíneas, y obtuvieron en promedio un valor de pH de 6,7.

En el ensayo realizado por Pérez (2006), cuando se alimentó a los ovinos con pastura cortada durante la mañana sí se obtuvieron valores de pH similares a los que nosotros registramos. Algo similar sucedió en un experimento realizado en ovinos alimentados con paja de trigo, en el cual el pH ruminal no descendió por debajo de 6,6 durante las primeras 12 horas después de la alimentación por la mañana (Mould *et al.*, 1983).

Dados estos resultados, resulta coherente que no hayan existido efectos de los tratamientos en la síntesis microbiana y posiblemente tampoco de la degradabilidad ruminal de la FND. Según Cardoso *et al.* (2000), tanto la síntesis microbiana como la degradabilidad de FND disminuyen cuando el pH es inferior a 6,2.

En cuanto al efecto del tiempo de acceso al alimento (TD vs 1D), en este trabajo no se encontraron diferencias para los valores de pH ruminal.

Con respecto al empleo de moduladores de la fermentación ruminal (Buffers y Sc), no generó diferencias significativas en el pH ruminal entre los tratamientos. Krause y Oetzel (2006) obtuvieron efectos benéficos adicionando buffers en dietas que contenían cantidades marginales de fibra efectiva. En este trabajo suponemos que se suministró, una cantidad adecuada de fibra efectiva en el alimento, debido a que el forraje se cortó a 5 cm del suelo, siendo ofrecida la planta entera y que los valores obtenidos de FND y FAD fueron 44,4 y 28,5 respectivamente.

Al igual que en este ensayo, Erasmus *et al.*, (2005) en un experimento realizado con 60 vacas Holstien alimentadas con una dieta de alfalfa y

concentrado, no detectó efecto ninguno de la adición de Sc en el pH ruminal. Mientras que, en ovejas que recibieron levaduras secas activas durante su adaptación a una dieta con alto nivel de concentrados, el pH ruminal se mantuvo en valores compatibles con una eficiente función ruminal (Chaucheyras-Durand y Fonty, 2006).

En este trabajo las concentraciones de N-NH₃ en el líquido ruminal, probablemente no resultaron una limitante para la síntesis de PM, dado que el valor promedio obtenido entre todos los tratamientos fue de 25,1 mg/dl. Estas concentraciones son superiores aún a las obtenidas en un trabajo realizado en nuestro país, en rumiantes pastoreando praderas implantadas de gramíneas y leguminosas en el cual el valor promedio fue de 20,1 mg/dl (Repetto *et al.*, 2001). También son superiores a las concentraciones registradas por Berzaghi *et al.* (1996), con un valor promedio de 22,4 mg/dl.

Los mayores valores registrados en este trabajo pueden ser debidos al gran porcentaje de leguminosas de la pastura suministrada a los animales. Al respecto, Abarca *et al.* (1999) detectó mayores concentraciones N-NH₃ en animales alimentados con leguminosas en comparación con animales alimentados con gramíneas.

Astibia *et al.* (1984), sugirieron que la síntesis de PM en ovejas es máxima cuando la concentración de N-NH₃ alcanza aproximadamente 5-8 mg/dl. Por lo tanto, la concentración de N-NH₃ en rumen fue más que suficiente para una correcta síntesis de PM.

En este trabajo la concentración de N-NH₃ no se vió afectada por el tiempo de acceso al alimento. De forma similar Kozloski *et al.* (2009), en un estudio realizado con corderos consumiendo como dieta base kikuyo (*Pennisetum clandestinum*) con distinto tiempo de acceso al alimento y suplementados con caseinato de calcio como fuente de nitrógeno proteico, tampoco encontraron diferencias en las concentraciones de N-NH₃ en rumen. En contrapartida cuando se utilizó como suplemento urea, sí se observaron variaciones de la concentración de N-NH₃ en relación al tiempo de acceso al alimento.

En este ensayo, cuando se compararon los tratamientos 1DP y 1D, se encontraron diferencias significativas en las concentraciones de N-NH₃. Los animales a pastoreo presentaron mayores concentraciones de N-NH₃ en rumen. Esto podría ser debido a que los animales a pastoreo realizarían una selección de la pastura, consumiendo mayor proporción de área foliar, la que tiene más contenido de proteínas, que conduciría a una mayor concentración de N-NH₃ en rumen. Mientras que, los animales del tratamiento 1D que consumieron el forraje que se les ofreció.

En este experimento el uso de aditivos (buffers o Sc) no generaron cambios en las concentraciones de N-NH₃ en rumen. De forma similar, en el trabajo de

Erasmus *et al.* (2005), mencionado anteriormente, la concentración de N-NH₃ no se vió afectada con la adición de Sc.

En resultados que no son presentados en este trabajo, no se encontraron efectos del uso de aditivos en los niveles de consumo ni en la MODI y MODR. De forma similar, en un trabajo realizado con terneros, no se encontró efecto de la adición de NaHCO₃ o, cultivos de levaduras en la dieta sobre la ingesta de MS y la digestibilidad de los animales (Quigley *et al.*, 1992). Contrariamente, en otro estudio realizado con terneros suplementados con Sc se observó un aumentó en la ingesta de MS (Chaucheyras-Durand *et al.*, 2008).

Los resultados obtenidos en este ensayo, indicarían que el uso de aditivos moduladores de la fermentación ruminal, no se justificaría cuando el pH ruminal se encuentra cercano a la neutralidad.

8. CONCLUSIONES

A partir de los datos obtenidos, se concluye que el tiempo de acceso al alimento y la adición o no de buffers o levaduras, no afectó el ambiente ruminal ni la síntesis de proteína microbiana.

Los animales a pastoreo presentaron mayores concentraciones de N-NH₃ que aquellos en jaulas metabólicas.

9. BIBLIOGRAFIA



- 1) Abarca, S., Ibrahim, M., Mannetje, L., Franco, M. (1999). Parámetros de fermentación ruminal de animales en pasturas mezcladas Gramínea-Leguminosa para el Trópico Húmedo de Costa Rica. *Rev. Fac. Agron.* 16:548-552.
- 2) Agricultural and Food Research Council. (1992). Nutritive Requirements of ruminant animals: protein. *Nutr. Abstr. Rev. series B* 62:787-835.
- 3) Akif Karsli, M., Russel, J.R. (1999). Ruminal Microbial Protein Synthesis in Sheep Fed Forages of Varying Nutritive Values. *Beef Res. Report* 1638. Iowa State Univ. 7p.
- 4) Association of Official Agricultural Chemists. (1984). *Official Methods of analysis*. 14^a. Edición. Arlington. 1141p.
- 5) Astibia, O.R., Cangiano, C.A., Cocimano, M.R. y Santini, F.J. (1984). Utilización del N por el rumiante. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 4:373-384.
- 6) Balcells, J., Guada, J.A., Castrillo, C., Gasa, J. (1991). Urinary excretions of allantoin and allantoin precursors by sheep after different rates of purine infusión into the duodenum. *J. Agric. Sci. (Cambridge)*. 116:309-317.
- 7) Bergman, E.N. (1990). Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. *Physiol. Rev.* 70:1580-1588.
- 8) Berzaghi, P., Herbein, J.H., Polan, C.E. (1996). Intake, site and extent of nutrient digestion of lactating cows grazing pasture. *J. Dairy Sci.* 79:1581-1589.
- 9) Brun-Bellut, J., Blanchart, G., Vignon, B. (1990). Effects of rumen degradable protein concentration in diets on digestion, nitrogen utilization and milk yield by dairy goats. *Small Rum. Res.* 3:575-581.
- 10) Brydl, E., Jurkovich, V., Könyves, L., Kutasi, J. (2005). Characterisation of the biological activity of viable yeast on the basis of oxygen consumption in the ruminal fluid. *International Society for Animal Hygiene*. Warsaw, Poland. 1:151-154.
- 11) Cajarville, C., Curvelo, A., Errandonea, N., Alonso, M., Aguerre, M., Repetto, J.L. (2000). Efecto de la suplementación con diferentes granos sobre el ambiente ruminal de bovinos a pastoreo. I: pH ruminal y cinética de degradación de distintos forrajes. XXI Congreso Mundial de Buiatría, Punta del Este, Uruguay. p 146.
- 12) Cajarville, C., Aguerre, M., Britos, A., Tebot, I., Pérez, A., Elizondo, V., Repetto, J.L. (2006). Effect of feeding frequency of fresh forage on ruminal pH: data review. XIV International Symposium Lameness in Ruminant. Uruguay-Colonia. 7-11 Noviembre, p 96.
- 13) Cardoso, R.C., Valadares Filho, S.C., Coelho da Silva, J.F., Paulino, M.F., Valadares, R.F.D., Cecon, P.R., Costa, M.A.L., Oliveira, R.V., (2000). Síntese microbiana, pH e concentração de amônia ruminal e balanço de compostos nitrogenados, em novilhos F1 Limousin x Nelore. *Rev. Bras. Zootec.* 29:1844-1852.

- 14)Carro, M.D., Lebzien, P., Rohr, K. (1992). Effects of yeast culture on rumen fermentation, digestibility and duodenal flow in dairy cows fed a silage based diet. *Livest. Prod. Sci.* 32:219–229.
- 15)Castro, T., Manso, T., Mantecón, A.R., Carro, M.D. (2002). Effect of either once or twice daily concentrate supplementation of wheat straw on voluntary intake and digestion in sheep. *Small Rum. Res.* 46:43–50.
- 16)Cerrato, M., Calsamiglia, S., Ferret, A. (2005). Efectos del tiempo a pH subóptimos y el número de ciclos sobre la fermentación microbiana ruminal en cultivo continuo. Disponible en: http://www.aida-itea.org/jornada37/3_nutricion/6_RVNII/rvnii-7_cerrato_ciclos2005.pdf. Fecha de consulta: 10/05/2006.
- 17)Chaucheyras-Durand, F., Fonty, G. (2006). Effects and modes of action of live yeasts in the rumen. *Biología (Bratislava)* 61:741–750.
- 18)Chaucheyras-Durand, F., Walker, N.D., Bach, A. (2008). Effects of active dry yeasts on the rumen microbial ecosystem: Past, present and future. *Anim. Feed Sci. Tech.* 145:5–26.
- 19)Chen, X.B., Hovell, F.D., Orskov, E.R., Brown, D.S. (1990). Excretion of purine derivatives by ruminants: effect of exogenous nucleic acid supply on purine derivative excretion by sheep. *Br. J. Nutr.* 63:42-131.
- 20)Clark, J.H., Klusmeyer, T.H., Cameron, M.R., (1992). Microbial protein synthesis and flows of nitrogen fractions to the duodenum of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 75:2304–2323.
- 21)Dewhurst, R.J., Davies, D.R., Merry, R.J. (2000). Microbial protein supply from the rumen. *Anim. Feed Sci. Tech.* 85:1-21.
- 22)Erasmus, L.J., Robinson, P.H., Ahmadi, A., Hinders, R., Garrett, J.E. (2005). Influence of prepartum and postpartum supplementation of a yeast culture and monensin, or both, on ruminal fermentation and performance of multiparous dairy cows. *Anim. Feed Sci. Tech.* 122:219–239.
- 23)Erdman, R.A., Hemken, R.W., Bull, L.S. (1982). Dietary sodium bicarbonate and magnesium oxide for early postpartum lactating dairy cows: effect of production, acid–base metabolism and digestion. *J. Dairy Sci.* 65:712-731.
- 24)Fujihara, T., Orskov, E.R., Reeds, P.J., Kyle, D.J. (1987). The effect of protein infusion on urinary excretion of purine derivatives in ruminants nourished by intragastric nutrition. *J. Agric. Sci. (Camb.)* 109:7-12.
- 25)Galdámez-Cabrera, N. W., Coffey, K. P., Coblenz, W. K., Turner, J. E., Scarbrough, D. A., Johnson, Z. B., Gunsaulis, J. L., Daniels, M. B., Hellwig, D. H. (2003). In situ ruminal degradation of dry matter and fiber from bermudagrass fertilized with different nitrogen rates and harvested on two dates. *Anim. Feed Sci. Tech.* 105:185-198.
- 26)Goering, H.K., Van Soest, P.J. (1970). Forage fiber analysis (apparatus, reagents, procedures and some applications). *Agric. Handbook* 379, USDA, 20p.
- 27)Gomez, C. (2003). Utilización de aditivos en la alimentación de vacas lecheras. Disponible en: tarwi.lamolina.edu.pe/~cgomez/utilizacionaditivosfeb2003.ppt Fecha de consulta: 07/06/09.

- 28) Guedes, C.M., Goncalves, D., Rodrigues, M.A.M., Dias-da-Silva, A. (2008). Effects of a *Saccharomyces cerevisiae* yeast on ruminal fermentation and fibre degradation of maize silages in cows. *Anim. Feed Sci. Tech.* 145:27–40.
- 29) Hoover, W.H., Stokes, S.R., (1991). Balancing carbohydrates and proteins for optimum rumen microbial yield. *J. Dairy Sci.* 74:3630–3644.
- 30) Hristov, A.N., McAllister, T.A., Cheng, K.J. (1997). Effect of carbohydrate level and ammonia availability on utilization of alpha-amino nitrogen by mixed ruminal microorganisms *in vitro*. *Proc. West. Sect. Am. Soc. Anim. Sci.* 48:186-189.
- 31) Hristov, A.N., Ropp, J.K., Grandeén, K.L., Albedi, S., Etter, R.P., Melgar, A., Foley, A.E. (2005). Effect of carbohydrate source on ammonia utilization in lactating dairy cows. *J. Anim. Sci.* 83:408-421.
- 32) Huhtanen, P., Khalili, H., 1990. The effect of sucrose supplements on microbial polysaccharidase activities associated with rumen particulate material. En : Hoshino, S., Onoderz, R., Minato, H., Itabashi, H. *The Rumen Ecosystem, the Microbial Metabolism and its Regulation*. Japan Scientific Societies Press, Tokyo, Japan, pp. 121–128.
- 33) Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias. (2009). Disponible en: <http://www.inia.org.uy/online/site/33995811.php#seccion2575> Fecha de consulta: 26/6/09
- 34) James, L.G., Wohlt, J.E. (1985). Effect of supplementing equivalent cation amounts from NaCl, MgO, NaHCO₃ and CaCO₃ on nutrient utilization and acid–base status of growing Dorset lambs fed high concentrate diets. *J. Anim. Sci.* 60:307-315.
- 35) Khalili, H., Sairanen, A. (2000). Effect of concentrate type on rumen fermentation and milk production of cows at pasture. *Anim. Feed Sci. Tech.* 84:199.
- 36) Kozloski, G.V., Lima, L.D., Cadorin, Jr. R.L., Bonnacarrère Sanchez, L.M., Senger, C.C.D., Fiorentini, G., Härter, C.J. (2007). Microbial colonization and degradation of forage 3 samples incubated *in vitro* at different initial pH. *Anim. Feed Sci. Tech.* 6: 31.
- 37) Kozloski, G.V., Cadorin, Jr R.L., Härter, C.J., Oliveira, L., Alves, T.P., Mesquita, F.R., Castagnino, D.S. (2009). Effect of supplemental nitrogen source and feeding frequency on nutrient supply to lambs fed a kikuyu grass (*Pennisetum clandestinum*) hay-based diet. *Small Rum. Res.* 81:112–118.
- 38) Krause, M., Oetzel, G.R. (2006). Understanding and preventing subacute ruminal acidosis in dairy herds: A review. *Anim. Feed Sci. Tech.* 126:215–236.
- 39) Lapierre, H., Berthiaume, R., Raggio, G., Thivierge, M.C., Doepel, L., Pacheco, D., Dubreuil, P., Lobley, G.E. (2005). The route of absorbed nitrogen into milk protein. *Anim. Sci.* 80:11-22.
- 40) Lee, M., Jones, E.L., Moorby, J.M., Humphreys, M.O., Theodorou, M.K., Macrae, J.C., Scollan, N.D. (2002). Production responses from lambs grazed on *Lolium perenne* selected for an elevated water-soluble carbohydrate concentration. *Anim. Res.* 50:441-449.

- 41) Lesmeister, K.E., Heinrichs, A.J., Gabler, M.T. (2004). Effects of supplemental yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) culture on rumen development, growth characteristics, and blood parameters in neonatal dairy calves. *J. Dairy Sci.* 87:1832–1839.
- 42) McDonald, P., Edwards, R.A., Greenhalgh, J.F.D., Morgan, C.A. (2006). *Nutrición Animal*. 6a. ed., Acribia. Zaragoza. 587p.
- 43) Mould, F.L., Ørskov, E.R., Mann, S.O. (1983). Associative effects of mixed feeds. Part I. Effects of type and level of supplementation and the influence of the rumen fluid pH on cellulolysis in vivo and dry matter digestion of various roughages. *Anim. Feed Sci. Tech.* 10:15–30.
- 44) Moya, J.M., Bayo, F.A. (2006). Disponible en: <http://estructurauruguay.wordpress.com/category/medios/caracteristicas-principales-del-pais/> Fecha de consulta: 26/06/09.
- 45) Napoli, G.M., Santini, F.J. (1988). Suplementación energético-proteica de forrajes frescos en condiciones de pastoreo: I. Efectos sobre el medio ambiente ruminal y la degradabilidad proteica. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 8:39.
- 46) National Research Council. (2001). *Nutrient Requirements of Dairy Cattle*, 17a ed. National Academic Press, Washinton, D.C. 408p.
- 47) Oetzel, G.R., Nordlund, K.V. (1998). Effect of dry matter intake and feeding frequency on ruminal pH in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 81(suplemento.1):297p.
- 48) Owens, F.N., Secrist, D.S., Hill, W.J., Gill, D.R. (1998). Acidosis in cattle: a review. *J. Anim. Sci.* 76:275–286.
- 49) Pereira, D.H., Gomes, O., Ceolin da Silva, B., Leão, M.I., Valadares Filho, S., Martins, F.H., Garcia, R. (2007). Intake and total and partial digestibility of nutrients, ruminal pH and ammonia concentration and microbial efficiency in beef cattle fed with diets containing sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) silage and concentrate in different ratios. *Livestock Sci.* 107:53–61.
- 50) Pérez, J.F., Bacells, J., Guada, J.A., Castrillo, C. (1997). Rumen microbial production estimated either from urinary purine derivative excretion or from direct measurements of 15N and purine bases as microbial markers: effect of protein source and rumen bacteria isolates. *J. Anim. Sci.* 65:225-236.
- 51) Pérez, A. (2006). pH, Amoníaco, Ácidos Grasos Volátiles y Producción de Proteína Microbiana en el Rumen de Corderos, según el Horario de Corte de la Pastura Consumida. Tesis de Grado, Facultad de Veterinaria. UdelaR. 36p.
- 52) Puchala, R., Kulasek, G.W. (1992). Estimation of microbial protein flow from the rumen of sheep using microbial nucleic acid and urinary excretion of purine derivatives. *Can. J. Anim. Sci.* 72:821-830.
- 53) Quigley, J.D., Wallis, L.B., Dowlen, H.H., Heitmann, R.N. (1992). Sodium Bicarbonate and Yeast Culture Effects on Ruminal Fermentation, Growth, and Intake in Dairy Calves. *J. Dairy Sci.* 75:3531-3538.
- 54) Radostits, O.M., Gay, C.C., Blood, D.C., Hinchcliff, K.W. (2002). *Tratado de las enfermedades del ganado bovino, porcino, caprino y equino*. 9 a. ed. Madrid. McGraw-Hill. Vol I: 1206p.

- 55) Rémond, D., Chaise, J.P., Delval, E., Poncet, C. (1993). Net Flux of Metabolites Across the Ruminal Wall of Sheep Fed Twice a Day With Orchardgrass Hay. *J. Anim. Sci.* 71:2529-2538.
- 56) Repetto, J.L., Aguerre, M., Alonso, M., Curbelo, A., Errandonea, N., Cajarville, C. (2001). Concentración de Amoniaco Ruminal en Vacas a Pastoreo Suplementadas con Diferentes Granos. VII Congreso Nacional de Veterinaria, Montevideo. Sección Rumiantes. CD-ROM.
- 57) Robertson, J.B., Van Soest, P.J. (1981). The detergent system of analysis and its application to human foods. 123-158. En: James, W.P.T., Theander, O., Dekker, M. The analysis of dietary fiber in food. Ed. Marcel Dekker. New York.
- 58) Rogers, J.A., Muller, L.D., Snyder, T.J., Maddoi, T.L. (1985). Milk production, nutrient digestion and rate of digesta passage in dairy cows fed long or chopped alfalfa hay supplemented with sodium bicarbonate. *J. Dairy Sci.* 68:868-880.
- 59) Russell, J.B. (1996). Dairy Forage Research Center. Informational Conference with dairy and forage and industries. USA. 61p.
- 60) Russell, J.B. (1998). Strategies that ruminal bacteria use to handle excess carbohydrate. *J. Anim. Sci.* 76:1955-1963.
- 61) Sandoval, C.A., Herrera, F. (1999). Estimación de la síntesis de proteína microbiana en rumiantes a través de la medición de los derivados de purina en orina. *Rev. Biomed.* 10:241-251.
- 62) Santra, A., Chaturvedi, O.H., Tripathi, M.K., Kumar, R., Karim, S.A. (2003). Effect of dietary sodium bicarbonate supplementation on fermentation characteristics and ciliate protozoal population in rumen of lambs. *Small Rum. Res.* 47:203-212.
- 63) Synonds, H. W., Mather, D., Collis, K. A. (1981). The maximum capacity of the liver of adult dairy cows to metabolize ammonia. *Brit. J. Nut.* 46:481-486.
- 64) Stewart, C.S. (1977). Factors affecting cellulolytic activity of rumen contents. *Appl. Environ. Microbiol.* 33:497-502.
- 65) Tamminga, S. y Van Vuuren, A.M. (1988). Formation and utilization of end-products of lignocellulose degradation in ruminants. *Anim. Feed Sci. Tech.* 21:141-159.
- 66) Thompson, P., Hentzen, A., Schultheiss, W. (2006). The effect of rumen lesions in feedlot calves: which lesions really affect growth? Proceedings from the 4th Schering Plough Ruminant day, University of Pretoria, Pretoria, South Africa, pp. 23-27.
- 67) Trevaskis, L. M., Fulkerson, W. J., Gooden, J. M. (2001). Provision of certain carbohydrate-based supplements to pasture-fed sheep, as well as time of harvesting of the pasture, influences pH, ammonia concentration and microbial protein synthesis in the rumen. *Austr. J. Exp. Agric.* 41:21-27.
- 68) Van Soest, P.J. (1994). Nutritional ecology of the ruminant. 2a. ed. Ithaca. Cornell University. 476p.
- 69) Vargas, G.A., Kolver, E.S. (1997). Microbial and Animal Limitations to Fiber Digestion and Utilization. *J. Nutr.* 127:819-823.

- 70) Wheeler, W.E. (1980). Gastrointestinal tract pH environment and the influence of buffering materials on the performance of ruminants. *J. Anim. Sci.* 51:224-235.
- 71) Williams, P.E.V., Tait, C.A.G., Innes, G.M., Newbold, C.J. (1991). Effects of the inclusion of yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae* plus growth medium) in the diet of dairy cows on milk yield and forage degradation and fermentation patterns in the rumen of steers. *J. Anim. Sci.* 69:3016.
- 72) Williams, P.E.V., Newbold, J.C. (1990). Rumen probiosis: the effects of novel microorganisms on rumen fermentation and rumen productivity. Ed: Haresign, W., Cole, D.J.A. (Eds.), *Recent Advances Anim. Nut.* Butterworths, London, p. 211.
- 73) Young, E.G., Conway, C.F. (1942). On the estimation of allantoin by the Rimini-Schryver reaction. *J. Biol. Chem.* 142:839-853.