

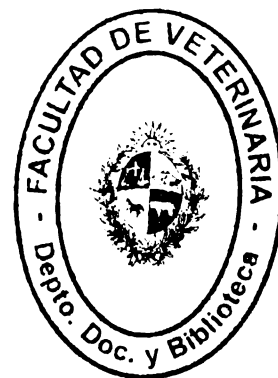
**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**EFFECTO DEL HORARIO DE PASTOREO SOBRE EL AMBIENTE RUMINAL Y LA  
POTENCIA DEL INÓCULO USADO EN PRUEBAS IN VITRO EN BOVINOS**

por

**Ximena Cecilia GÓMEZ FERNÁNDEZ †**



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  
2011**

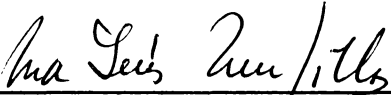


FV-29294


# PÁGINA DE APROBACIÓN

Tesis de grado aprobada por:

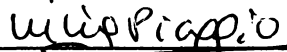
Presidente de mesa:

  
\_\_\_\_\_  
ANA INES DUJILLO  
nombre completo y firma

Segundo miembro (Tutor):

  
\_\_\_\_\_  
nombre completo y firma  
CECILIA CASANUEVA

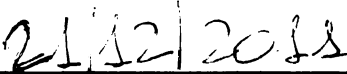
Tercer miembro:

  
\_\_\_\_\_  
nombre completo y firma  
LUCIA PAGGIO

Cuarto miembro (Co-tutor):

\_\_\_\_\_  
nombre completo y firma


Fecha:

  
\_\_\_\_\_  
21/12/2013

Autor :

  
\_\_\_\_\_  
nombre completo y firma  
XIMENA GOMEZ

FACULTAD DE VETERINARIA

Aprobado con ..... (19/01/14) 

# AGRADECIMIENTOS

A mis tutores Cecilia Cajarville y José Luis Repetto por su guía y dedicación.

Al equipo docente del Departamento de Nutrición Animal y al personal del Campo Experimental N°2 de Libertad por su colaboración.

A mis seres queridos por su amor, por todo.

Dedicado especialmente a Pinocho.

## LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

	Página
<b>Tabla I.</b> Composición química de la pastura consumida por los animales al inicio del diseño experimental.....	9
<b>Tabla II.</b> Contenido de carbohidratos solubles (CHS), nitrógeno (N) y su relación, según el horario de corte de la pastura consumida por los animales (M o T) y el período experimental (I, o II). Datos expresados en base seca (n=14; M: 6, T:8).....	12
<b>Tabla III.</b> Valores promedios de pH ruminal y concentración de N-NH <sub>3</sub> en el líquido ruminal de vacas a pastoreo directo consumiendo pastura templada durante la mañana (M) o la tarde (T).....	12
<b>Tabla IV.</b> Digestibilidad in vitro (IVTD, %) de una colección de 12 alimentos incubados utilizando como inóculo líquido ruminal de los animales alimentados en la mañana (M) y en la tarde (T).....	16
<b>Figura 1.</b> pH ruminal en vacas pastoreando de mañana o de tarde. Medias ± error estándar (ES).....	13
<b>Figura 2.</b> N-NH <sub>3</sub> ruminal en vacas pastoreando de mañana o de tarde. Medias ± error estándar (ES).....	14
<b>Figura 3.</b> pH y N-NH <sub>3</sub> ruminal en vacas pastoreando de mañana y de tarde. Medias ± error estándar (ES).....	15

## ABREVIATURAS

AGV: ácidos grasos volátiles

CHO: carbohidratos

CHOE: carbohidratos estructurales

CHONE: carbohidratos no estructurales

CHOS: carbohidratos solubles

FDA: fibra ácido detergente

FDN: fibra neutro detergente

M: pastoreo en la Mañana (tratamiento M)

mo: microorganismos

MS: materia seca

N: nitrógeno

N-NH<sub>3</sub>: nitrógeno amoniacal

PM: proteína microbiana

T: pastoreo en la Tarde (tratamiento T)

IVTD: digestibilidad verdadera in vitro

# TABLA DE CONTENIDO



Página

PAGINA DE APROBACION.....	I
AGRADECIMIENTOS.....	II
LISTA DE TABLAS Y FIGURAS.....	III
ABREVIATURAS.....	IV
TABLA DE CONTENIDO.....	V
1.RESUMEN.....	1
2.SUMMARY.....	2
3.INTRODUCCIÓN.....	3
4.REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	4
4.1.Ambiente Ruminal.....	4
4.1.1.pH.....	4
4.1.2.Nitrógeno Amoniacal.....	5
4.2.Principales características del contenido de CHOS y N de las pasturas templadas.....	6
5.OBJETIVOS.....	8
5.1.Objetivo General.....	8
5.2.Objetivos Particulares.....	8
6.HIPOTESIS.....	8
7.MATERIALES Y MÉTODOS.....	9
7.1.Animales, dietas y tratamientos.....	9
7.2.Análisis de laboratorio.....	10
7.2.1.Composición química de la pastura.....	10
7.2.2.pH.....	10
7.2.3.Nitrógeno Amoniacal.....	10
7.2.4.Digestibilidad in vitro.....	11
7.3.Análisis estadísticos.....	11
8.RESULTADOS.....	12
8.1.Contenido de CHOS de la pastura ofrecida.....	12
8.2.Ambiente ruminal.....	12
8.3.Digestibilidad in vitro.....	15
9.DISCUSIÓN.....	16
9.1.Contenido de CHOS de la pastura.....	16
9.2.pH.....	17
9.3.Nitrógeno Amoniacal.....	18
9.4.Digestibilidad in vitro.....	20
10.CONCLUSIONES.....	21
11.BIBLIOGRAFÍA.....	22

## **1. RESUMEN**

El principal objetivo de este estudio fue determinar el efecto del horario de pastoreo sobre el ambiente ruminal de animales consumiendo pasturas templadas. Para ello cuatro vacas lecheras de la raza Holando fueron sometidas a un pastoreo restringido, durante 4 horas, en dos momentos del día: a la hora 7:00 (M) o a las 18:00 h (T) en dos períodos, en un diseño experimental cruzado. Luego de tres semanas de adaptación a la dieta, se extrajo líquido ruminal cada hora durante 24 horas analizando pH y amoníaco. Utilizando el líquido ruminal extraído en la mañana y en la tarde, se incubó in vitro una colección de alimentos para estudiar su digestibilidad y variaciones de la misma. Los datos fueron analizados estadísticamente como medidas repetidas usando un modelo mixto. El pH ruminal no mostró diferencias significativas entre tratamientos, pero sí entre horas ( $P < 0,0001$ ). Los mínimos valores de pH registrados fueron de 5,57 para M y de 5,42 para T, seis y cuatro horas luego del comienzo de la ingesta respectivamente. Con respecto a los valores de  $N-NH_3$  ruminal fueron significativamente menores para T ( $P = 0,0096$ ). Los valores más bajos obtenidos fueron de 6,77 mg/dl para M y 5,38 mg/dl para T, dieciocho y catorce horas luego del comienzo del pastoreo respectivamente. La IVTD fue significativamente menor ( $P = 0,0319$ ) cuando se incubaron alimentos con el inóculo sustraído de animales a pastoreo por la tarde.

Palabras clave: pH ruminal, nitrógeno amoniacal, IVTD, pasturas templadas.

## **2. SUMMARY**

The main objective from this research was to analyze the effect of grazing moment in the day on ruminal environment of animals fed with temperate pasture. Four dairy cows (Holland breed) were submitting to a restricted grazing period of four hours, in two moments of the day (at 7 AM or at 6 PM) in two periods of time, in a crossed experimental design. After three weeks of adaptation to food, each hour during 24 hr ruminal liquid was extracted, analyzing its pH and ammoniac concentration. Using morning (M) and afternoon (A) ruminal liquid samples, a pool of food was incubated *in vitro* in order to study its digestibility and variation. Data was statistically analyzed with a mixed model using repeated measures. Ruminal pH showed no significant differences between treatments, but was different between hours ( $P < 0.0001$ ). The least pH values registered were 5.57 for M and 5.42 for A, six and four hours after starting intake, respectively. Ruminal N-NH<sub>3</sub> values were lower in A ( $P=0.0096$ ) compared to M. The lowest values obtained were 6.77 mg/dL for the morning and 5.38 mg/dL for the afternoon, for eighteen and fourteen hr after starting grazing, respectively. IVTD was lower ( $P=0.0319$ ) when food was incubated with animal extracted inoculum during A grazing.

Key words: ruminal pH, ammonia, IVTD, temperate pasture



### **3. INTRODUCCIÓN**

La pastura constituye un alimento de alto valor nutritivo para los rumiantes, y en nuestro país juega un rol principal en la alimentación en nuestros sistemas de producción. Si bien la suplementación es de gran importancia sobre todo para el ganado lechero, en sistemas de cría extensivos y semi-intensivos, tanto para ganado bovino como para ovinos, la alimentación es fundamentalmente a base pastoril.

La estrategia alimentaria de los rumiantes se basa en la simbiosis establecida entre los microorganismos ruminales y el animal. Mientras el rumiante aporta alimentos y las condiciones adecuadas del medio (temperatura, acidez, anaerobiosis, ambiente reductor), las bacterias utilizan parcialmente los alimentos haciendo útiles los forrajes (de otra forma indigestibles para los mamíferos) y aportando productos de la fermentación con valor nutritivo para el rumiante (los ácidos grasos volátiles) y la proteína microbiana. Cuando las características del rumen se alteran, se produce un desequilibrio en la población microbiana ruminal (Díaz Plascencia, 2009), por ello se deben mantener condiciones apropiadas para el crecimiento microbiano (pH, temperatura y humedad) (Owens y Goetsch , 1988).

Está bien documentado que, en el forraje, la concentración del total de carbohidratos no estructurales (CNE) varía debido al potencial de las plantas en acumular hidratos de carbono durante el fotoperíodo (Burns et al., 2007). En varios estudios realizados, tanto en nuestro país como en el exterior, se ha observado un incremento en la concentración de carbohidratos solubles (CHOS) en las pasturas durante la tarde (Ciavarella, et al. 2000; Repetto, et al. 2003 a y b; Burns et al., 2007; Brito, et al. 2008; Antunez y Caramelli, 2009).

En el Uruguay, trabajos realizados en el Departamento de Nutrición Animal de la Facultad de Veterinaria han demostrado que el ambiente ruminal de animales pastoreando praderas templadas de alta calidad, es distinto del que sería un ambiente ruminal óptimo (Cajarville et al., 2000). Este mismo grupo de trabajo observó que, tanto en ovinos como en terneras, se producen alteraciones a nivel del ambiente ruminal debido al aumento de CHOS en la dieta (Pérez, 2006; Cazzuli, 2010).

De acuerdo a lo referido anteriormente, se planteó investigar cómo influye el horario de pastoreo (mañana y tarde) en el ambiente ruminal (realizando mediciones de pH y amoníaco) en vacas consumiendo una pastura templada de buena calidad, y utilizando el líquido ruminal como inóculo para calcular la digestibilidad de una colección de alimentos fibrosos incubándolos in vitro.

## **4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

### **4.1. AMBIENTE RUMINAL**

El ambiente ruminal es el espacio, dentro del rumen, en donde conviven microorganismos de diversos tipos que, combinados con factores físicos como la humedad, temperatura y pH, llevan a cabo parte de la digestión de los alimentos que ingiere el rumiante. Dentro de éstos se destacó los parámetros de pH y N-NH<sub>3</sub>, que fueron medidos y analizados en el presente trabajo.

El pH es uno de los principales parámetros en afectar directamente el crecimiento de algunos grupos bacterianos, y juega un papel central en el mantenimiento de una fermentación ruminal equilibrada (Pérez, 2010). Es un factor determinante, y un producto clave, para la digestión ruminal (De Veth y Kolver, 2001a y b). La mayoría de las bacterias del rumen exhiben una óptima actividad y crecimiento cuando el pH ruminal alcanza valores de 6.0 a 6.9 (Van Soest, 1994). Por lo tanto, las fluctuaciones de pH pueden afectar a la flora microbiana y, por ende, a la fermentación ruminal (Pérez, 2006). En vacas lecheras alimentadas con pasturas de buena calidad, el pH se encuentra, a menudo, por debajo de los valores recomendados para una óptima digestión (De Veth y Kolver, 2001a y b).

En el rumen se producen cantidades importantes de N-NH<sub>3</sub> mediante la degradación microbiana de proteínas de la dieta, hidrólisis de compuestos que contienen nitrógeno no proteico dietético y endógeno, e intercambio y degradación de células microbianas (Merchen, 1988). Tanto en estudios *in vitro* como *in vivo*, este compuesto ha demostrado ser el principal nutriente nitrogenado necesario para el crecimiento de los mo del rumen. La mayoría de las bacterias ruminales pueden utilizar N-NH<sub>3</sub> como fuente de nitrógeno (N) para su crecimiento (Russell y Wilson, 1996).

#### **4.1.1. pH**

El pH ruminal depende fundamentalmente de 3 factores: la producción de ácido, la capacidad tampón del medio ruminal y la eliminación de protones por absorción o flujo al tracto digestivo inferior (Díaz Plascencia, 2009). Dicho parámetro, también está influenciado por la tasa de digestión, la tasa de liberación del contenido soluble de las células de la planta y la velocidad en la producción de saliva (Taweel et al., 2005).

Según Van Soest (1994), el pH ruminal de animales que consumen solamente pasturas, siempre está cercano a valores óptimos para la actividad de las bacterias celulolíticas (6,7 ± 0,5).

El valor de pH puede oscilar de 5,5 a 7,2, con cifras inferiores luego de la ingesta. Las bacterias celulolíticas disminuyen su actividad cuando el pH desciende por debajo de 6, pudiendo inactivarse si se prolonga en el tiempo el descenso del mismo (Owens y Goetsch, 1988; McDonald, 2002). De acuerdo con lo anterior, Hess et al. (1996) citan que valores de pH alrededor de 6 podrían resentir la actividad de las bacterias celulolíticas, con la consiguiente disminución en la digestibilidad de la fibra y síntesis de proteína microbiana. Es esencial que el pH ruminal se mantenga por encima de 6,0 para garantizar las condiciones ideales para su funcionamiento (Calsamiglia, 1997).

De acuerdo con lo anterior, Rearte y Santini (1989) encontraron que una moderada reducción del pH a 6,2 incrementó la depresión en la digestión de la fibra, y un descenso más severo de pH a menos de 6, reduce el número de microbios celulolíticos y limita severamente la digestión de la fibra. Los mismos autores refieren que un ambiente ruminal óptimo en su actividad celulolítica, es aquel que presenta un pH de 6,7-6,8.

Por otra parte, De Veth y Kolver (2001a), utilizaron sistemas de fermentación continuos para determinar el pH necesario para la digestión óptima de pasturas de alta calidad en cuatro niveles de control de pH (5,4, 5,8, 6,2 y 6,6). Este experimento estableció que la digestibilidad de la MS de pasturas de alta calidad se optimizó cuando el pH fue de 6,35, aunque una gran disminución en la digestibilidad sólo ocurrió por debajo de un pH ruminal de 5,8.

El contenido en humedad y la naturaleza física del alimento influye sobre la producción de saliva, su secreción es mayor con alimentos fibrosos, secos y maduros y menor con respecto a alimentos tiernos y jugosos. La capacidad tampón de la saliva es probablemente una de sus funciones más importantes. Diversos estudios han demostrado que esta capacidad se debilita cuando los valores de pH ruminal se encuentran por encima de 7,5 y por debajo de 5,5 (Church, 1988). Según Mertens (1997), la actividad masticatoria estimula la producción de saliva, la cual puede aumentar la capacidad buffer del rumen y prevenir el descenso del pH ruminal.

#### 4.1.2. Nitrógeno Amoniacal

Los compuestos nitrogenados más importantes en las pasturas se encuentran en un 80% en forma de proteína verdadera. Para los rumiantes las características más importantes de las proteínas de los forrajes son su degradabilidad y su digestibilidad (McDonald, 2002).

La proteína de las pasturas templadas de alta calidad, se caracteriza por ser altamente soluble y de muy rápida degradación (Repetto et al., 2005), dando como resultado altas concentraciones instantáneas de N-NH<sub>3</sub> en el rumen (Cajarville et al., 2006 a y b). Los microorganismos no pueden aprovechar ese N-NH<sub>3</sub> si no disponen de una fuente de energía de rápida degradación que le permita a los mo la síntesis de proteína (Moshtaghi e Ingalls, 1995), y según Rearte y Santini 1989, dichas pasturas

frecuentemente no contienen cantidades suficientes de CHOS para utilizar todo el N-NH<sub>3</sub> producido.

Si la cantidad de energía (E) presente en el rumen es limitada, la degradación de las proteínas de la dieta a N-NH<sub>3</sub>, por parte de los mo, y su captación por los mismos, serán también limitadas (Hristov et al., 1997). Por lo tanto, para lograr una máxima eficiencia de síntesis de proteína microbiana (PM), el N y la energía disponible en el rumen deben estar balanceados (Santini y Elizalde, 1994).

La mayoría de las bacterias ruminales puede utilizar N-NH<sub>3</sub> como fuente de N (Russell y Wilson, 1996), principalmente las bacterias celulolíticas (Van Soest et al., 1994). Parte de ese N-NH<sub>3</sub>, junto con péptidos y aminoácidos libres producidos durante su formación, son utilizados por los mo para la síntesis de PM. El resto del N-NH<sub>3</sub> producido en el rumen es absorbido, y una proporción variable regresa al rumen como urea en la saliva la cual rápidamente es transformada a N-NH<sub>3</sub> (Annison et al., 2002).

Una concentración de N-NH<sub>3</sub> en rumen de 5-8 mg/dl puede ser considerada como la concentración mínima necesaria para maximizar la eficiencia de síntesis de PM (Satter & Slyter, 1974; Van Soest, 1994; Rearte y Santini 1989). Sin embargo, otros autores, como Meherz et al. (1977), sostienen que las concentraciones de N-NH<sub>3</sub> deben ser de 20 mg/dl.

Trabajos realizados en Uruguay demuestran que las concentraciones de N-NH<sub>3</sub> ruminal, en vacas adultas, corderos y vaquillonas superaron el nivel mínimo necesario para una adecuada producción microbiana con un valor promedio de 20,1 mg/dl, 18,16 mg/dl y 20,79 mg/dl respectivamente, y por lo tanto no serian la limitante para el crecimiento bacteriano (Repetto et al., 2001; Pérez, 2006; Aguerre, 2010).

El pH puede modificar la proporción de N-NH<sub>3</sub> en el rumen, produciéndose un descenso en la concentración del mismo cuando el pH disminuye desde un valor de 7 a 5.8 (Shriver et al., 1986). Esto sumado a la reducción en la flora celulolítica debida al bajo pH, repercute en la digestibilidad de la fibra. Por lo tanto, en un ambiente ruminal con un bajo pH, se puede esperar un descenso del N-NH<sub>3</sub> con descenso de la flora celulolítica y, como consecuencia, una disminución en la digestibilidad de la fibra.

#### **4.2. PRINCIPALES CARACTERISTICAS DEL CONTENIDO DE CARBOHIDRATOS Y NITROGENO DE LAS PASTURAS TEMPLADAS**

El ritmo de crecimiento de la pastura depende del medio ambiente, de los nutrientes disponibles y de la cantidad de hojas que intercepten la luz. Algunos factores como el clima y la época del año, pueden afectar su valor nutritivo (McDonald, 2002).

Los carbohidratos de la pastura tienen un importante papel en la dieta del rumiante. Su metabolismo por los mo del rumen, determina la producción de ácidos grasos volátiles (AGV) que, a su vez, proporcionan el 70-80 % de las necesidades calóricas totales del rumiante (Fahey y Berger, 1988). Estos se clasifican de varias maneras, una de ellas los divide en: carbohidratos estructurales y carbohidratos no estructurales. Dentro de estos últimos encontramos a los azúcares (glucosa, fructosa, lactosa, entre otros), al almidón, pectinas, etc.

Los vegetales obtienen la energía a partir del sol a través del proceso llamado fotosíntesis. Como producto de dicho proceso se obtienen los CHOS que se almacenan en la planta y constituyen la reserva energética de la misma. Un mayor incremento lumínico promueve un aumento en la acumulación de CHOS y el metabolismo general del nitrógeno (N) (Van Soest, 1994; Antunez y Caramelli, 2009). Ese N necesita energía de la fotosíntesis para su reducción a amoníaco y síntesis de aminoácidos. Las nubes y la sombra, afectan la cantidad de luz que las plantas reciben, tendiendo a disminuir el valor nutritivo del forraje (Van Soest, 1994). De acuerdo con lo anterior, McDonald (2002) dice que los contenidos de azúcares y fructanos pueden verse notablemente afectados por la insolación recibida por las plantas. En líneas generales, en los días grises y nublados el contenido de carbohidratos solubles de las gramíneas es menor que en los días soleados.

En las pasturas templadas, a mayor calidad, mayor contenido proteico, menor contenido de fibra, mayor contenido de carbohidratos hidrosolubles (CHOS) y menor pH ruminal. En dichas pasturas el contenido de N es siempre alto pero los CHOS no son suficientes para la fermentación ruminal, y esto condena a una pérdida de N ya que para una óptima síntesis microbiana en el rumen es importante la relación entre CHOS y N (Rearte y Santini, 1989).

El contenido celular incluye, entre otros, los carbohidratos hidrosolubles (fructanos y azúcares como: glucosa, fructosa, sacarosa, etc.) y gran parte de la proteína. En las gramíneas de las zonas templadas, el carbohidrato de reserva fructano es el más abundante de los carbohidratos solubles, encontrándose principalmente en los tallos (McDonald, 2002). La sacarosa sirve como el principal vehículo para el transporte de energía y, en algunas plantas, para almacenarlo. Los CHOS del forraje representan la parte más rápidamente digestible de los carbohidratos no estructurales (Van Soest, 1994). Su contenido en las plantas es variable, y depende de la especie y de sus condiciones de desarrollo. Este contenido puede ser limitante para la fermentación durante el proceso de ensilado y para la síntesis microbiana en el rumen (Repetto et al., 2003a). Mayland et al., en el 2005, se observaron que henos elaborados a partir de alfalfa cortada por la tarde presentaban más CHOS que los realizados con forraje cortado por la mañana.

Los niveles de carbohidratos fácilmente fermentescibles limitan la eficiencia en la utilización del nitrógeno por los microorganismos ruminales (Nápoli y Santini, 1988 a y b). Esto se debe a que la producción de proteína microbiana en el rumen está influenciada por la cantidad y forma de los carbohidratos disponibles (como fuente de

energía para la flora), el nivel proteico de la dieta (Tebot et al, 2002), y el nivel de ingesta. Un aumento en el contenido de carbohidratos no estructurales (CNE) en la pastura mejoraría la capacidad de los microbios del rumen para capturar el amoníaco y de utilizarlo como una fuente de N para la síntesis PM (Rooke et al., 1987).

Las pasturas, en nuestro país, se caracterizan por presentar una composición de alto valor nutritivo (Cajarville et al 2007), y una alta fermentescibilidad lo que lleva a una alta producción de AGV, promoviendo un ambiente ruminal caracterizado por bajos valores de pH, fundamentalmente en los horarios posteriores a pastoreos intensos (Cajarville et al 2006 a y b, Cazzuli et al., 2007).

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1. OBJETIVO GENERAL**

Estudiar el efecto del horario de pastoreo sobre el ecosistema ruminal, en vacas consumiendo pasturas templadas.

### **5.2. OBJETIVOS PARTICULARES**

Estudiar las variaciones en los valores de pH y N-NH<sub>3</sub> ruminales en relación al horario de pastoreo.

Determinar si el horario en el que se pastorea una pradera tiene efectos en la actividad del inóculo ruminal extraído de los animales en estudio.

## **6. HIPÓTESIS**

En vacas a pastoreo de una pradera templada de buena calidad, en la tarde, debido a la mayor concentración de carbohidratos solubles con respecto a la mañana, se producirá un descenso en los valores de pH ruminal y un aumento en la disponibilidad de N-NH<sub>3</sub> ruminal. La eficiencia en la digestión de una colección de alimentos será mayor cuando estos sean incubados con líquido ruminal recogido de vacas que consumieron pasturas en la tarde con respecto a las alimentadas por la mañana, medida en pruebas in vitro.

## **7. MATERIALES Y MÉTODOS**

El presente ensayo experimental se desarrolló en el Campo Experimental N° 2 de la Facultad de Veterinaria, Ruta Nacional N°1 km 42 (Departamento de San José, 34° sur y 55° oeste), en los meses de agosto a octubre. Los análisis de composición química se realizaron en el laboratorio del Departamento Nutrición Animal de la Facultad de Veterinaria.

### **7.1. ANIMALES, DIETAS, TRATAMIENTOS y DISEÑO EXPERIMENTAL**

Se utilizaron cuatro vacas secas de la raza Holando ( $671 \pm 109.5$  kgPV), con cánulas implantadas en el saco dorsal del rumen y dispositivos permanentes para la extracción del líquido ruminal.

La dieta suministrada a los animales consistió en una pradera templada en estado vegetativo, compuesta por una mezcla de gramíneas (90%) y leguminosas (10%). Estas últimas fueron trébol rojo (*Trifolium pratense*), trébol blanco (*Trifolium repens*) y lotus (*Lotus corniculatus*). Las principales gramíneas fueron: raigrás (*Lolium multiflorum*) y Avena (*Avena sativa*), con predominio de ésta última.

Su composición química y biomasa por unidad de superficie se detalla en la Tabla I.

**Tabla I. Disponibilidad y composición química de la pastura consumida por los animales al inicio del diseño experimental.**

kg MS/ha	MS,%	FDN, %*	FDA, %*	PB, %*	CHOS, %*
4400	14,7	49,9	26,8	14,4	9,3

MS: materia seca, FDN: fibra neutro detergente, FDA: fibra ácido detergente, PB: proteína bruta, CHOS: carbohidratos solubles, \*: datos expresados en base seca.

**Alimentación:** Los animales fueron colocados en la pastura con una estaca y una cuerda de 3 metros de longitud, habilitando una superficie de pastoreo que permitiera que los animales consumieran la pastura sin restricción en cantidad, durante 4 horas al día. El resto del tiempo permanecieron en un piquete con agua a disposición pero sin alimento.

**Tratamientos:**

Tratamiento 1: Pastoreo en la mañana (7:00 hs.)

Tratamiento 2: Pastoreo en la tarde (18:00 hs.)

El ensayo se realizó utilizando un diseño experimental cruzado constituido por dos periodos: en el primero dos animales fueron sometidos al tratamiento 1 y los otros dos al tratamiento 2, mientras que en el segundo periodo los animales rotaron de modo que los 4 pasaron por los 2 tratamientos durante el ensayo. Cada periodo duró 17

días, culminando en una jornada de extracción donde, cada una hora, durante 24 horas, se colectó líquido ruminal con jeringa por un tubo de goma dispuesto a través de la cánula intraruminal (para medición de pH y amoníaco ruminal). Luego de finalizada dicha jornada de extracción se colectaron 500 ml más de líquido ruminal de cada animal para determinar la digestibilidad ruminal in vitro (% IVTD), como forma de medir la actividad del inóculo ruminal, de una colección de 12 alimentos previamente seleccionados. Dicha extracción se realizó inmediatamente luego de culminado el horario de pastoreo respectivo a cada animal.

El comienzo del experimento fue a fines del mes de agosto.

## 7.2. ANALISIS DE LABORATORIO

### 7.2.1. Composición química de la pastura

Se determinó la de composición química de la pastura ofrecida mediante análisis de: materia seca (MS), materia orgánica (MO) y proteína bruta (PB) según A.O.A.C (1984). Fibra neutro detergente (FDN) y fibra ácido detergente (FDA) de acuerdo con la técnica descrita por Goering y Van Soest (1970).

El contenido en carbohidratos solubles (CHOS) de la pastura se determinó siguiendo la técnica descrita por Yemm y Willis (1954). Todas las muestras se analizaron por triplicado, aceptando coeficientes de variación entre análisis del 3 al 5 % según el parámetro.

### 7.2.2. pH

El pH se midió inmediatamente luego de cada extracción del líquido ruminal con pHmetro digital.

### 7.2.3. Nitrógeno Amoniacal (N-NH<sub>3</sub> ruminal)

Posteriormente a cada extracción de líquido ruminal y, luego de medir el pH, se congeló una alícuota del mismo (10 ml), utilizando cloruro de sodio al 20% (10 ml) como conservante.

La concentración de N-NH<sub>3</sub> ruminal fue determinada por destilación directa de la muestra con tetraborato de sodio. Las muestras congeladas fueron analizadas en el Laboratorio del Departamento de Nutrición Animal de la Facultad de Veterinaria.



#### 7.2.4. Digestibilidad Ruminal in vitro (IVTD, %)

Se determinó la digestibilidad ruminal in vitro (IVTD) utilizando como inóculo 500 ml de líquido ruminal extraído de cada vaca al final de cada período. Para ello se utilizó una colección de 12 alimentos distintos (concentrados, fibrosos, de mala y buena calidad). Estos fueron previamente secados a estufa, luego molidos a 2 mm, y por último colocados en bolsas porosas individuales (porosidad 25 mm, F57 Ankom Tech. Corp.) durante 48 horas en un equipo DAISY® (Ankom Technology Corp. Fairport, NY, USA).

Tabla II. Colección de alimentos utilizados para la incubación in vitro.

<b>Concentrados</b>	Avena Pulpa de limón
<b>Fibrosos jóvenes</b>	Alfalfa 1er año, 1er corte Trébol rojo florecido Alfalfa 1er año Lotus Trébol rojo vegetativo
<b>Fibrosos maduros</b>	Fardo de pradera, mala calidad Sorgo forrajero Chala de maíz Paspalum Gramilla

Luego de la incubación, las bolsas fueron enjuagadas con agua corriente y lavadas durante 1 h a 100°C con una solución detergente neutro en un analizador de fibra Ankom220 (Ankom Technology Corp., NY, USA) y secadas en un horno a 105°C hasta peso constante. El IVTD (%) de cada sustrato incubado se calculó como el porcentaje de material desaparecido de las bolsas luego de la incubación y el lavado de las mismas.

### 7.3. ANALISIS ESTADÍSTICOS

Todos los resultados fueron analizados utilizando el software SAS (SAS institute, Cary NC, E.U.A., 2000).

Los parámetros de fermentación ruminal (pH y amoníaco) y la digestibilidad de la colección de alimentos (IVTD %), fueron comparados entre tratamientos utilizando el PROC MIXED considerando los efectos del período (P) y animal (A) como aleatorios y el tratamiento (T) como efecto fijo. Para comparar pH y amoníaco ruminal se utilizaron medidas repetidas en el tiempo, incorporando al modelo el efecto horario (H).

Modelos utilizados:

- Para IVTD%  $y_{ijk} = u + T_i + P_j + A_k + e_{ikj}$
- Para pH y N-NH<sub>3</sub>  $y_{ijkl} = u + T_i + P_j + A_k + H_l + e_{ijkl}$

Se consideró como diferencias significativas la  $P < 0,05$ .

## **8. RESULTADOS**

### **8.1. CONTENIDO DE CARBOHIDRATOS SOLUBLES DE LA PASTURA OFRECIDA**

En la tabla II se presentan los porcentajes de carbohidratos solubles (CHOS) y nitrógeno (N) de la pastura ofrecida a los animales. En la misma se puede apreciar un mayor contenido de CHOS durante la tarde, con diferencia significativa. Sin embargo para el N% no hubo diferencia significativa en los valores obtenidos entre tratamientos (M y T).

**Tabla III. Contenido de carbohidratos solubles (CHOS), nitrógeno (N) y su relación, según el horario de corte de la pastura consumida por los animales (M o T) y el período experimental (I, o II). Datos expresados en base seca.**

	Período Experimental					
	I		II		M vs T	
	M	T	M	T	ESM	P
CHOS%	7,99	10,6	20,3	22,9	0,312	0,003
N%	1,72	1,61	1,20	1,16	0,030	ns
CHOS/N	4,69	6,60	16,9	19,9	0,294	0,003

*M: forraje ofrecido en la mañana, T: forraje ofrecido en la tarde, ESM: error estándar de las medias, P: probabilidad estadística, ns: no significativo ( $P > 0.05$ )*

### **8.2. AMBIENTE RUMINAL (pH y N-NH<sub>3</sub>)**

En la siguiente tabla se presentan los valores medios de pH y N-NH<sub>3</sub>, obtenidos en los dos tratamientos, y según las variables tratamiento, hora y la interacción entre ambas.

**Tabla IV. Valores promedios de pH ruminal y concentración de N-NH<sub>3</sub> en el líquido ruminal de vacas a pastoreo directo consumiendo pastura templada durante la mañana (M) o la tarde (T).**

Variables	Tratamientos		ES	t	P	
	M	T			h	t*h
pH	6,20	6,16	0,14	ns	<0,001	ns
N-NH <sub>3</sub> , mg/dl	15,19	10,29	3,89	0,010	0,007	<0,001

*ES: error estándar, t: efecto tratamiento, h: efecto hora, txh: interacción entre tratamiento y hora, ns: no significativo ( $P > 0.05$ ).*

Con respecto al pH se observa que tanto el efecto tratamiento como la interacción tratamiento y hora, no fueron significativos los resultados en los valores obtenidos. Sin embargo, se halló una diferencia significativa cuando analizamos los datos según el efecto hora.

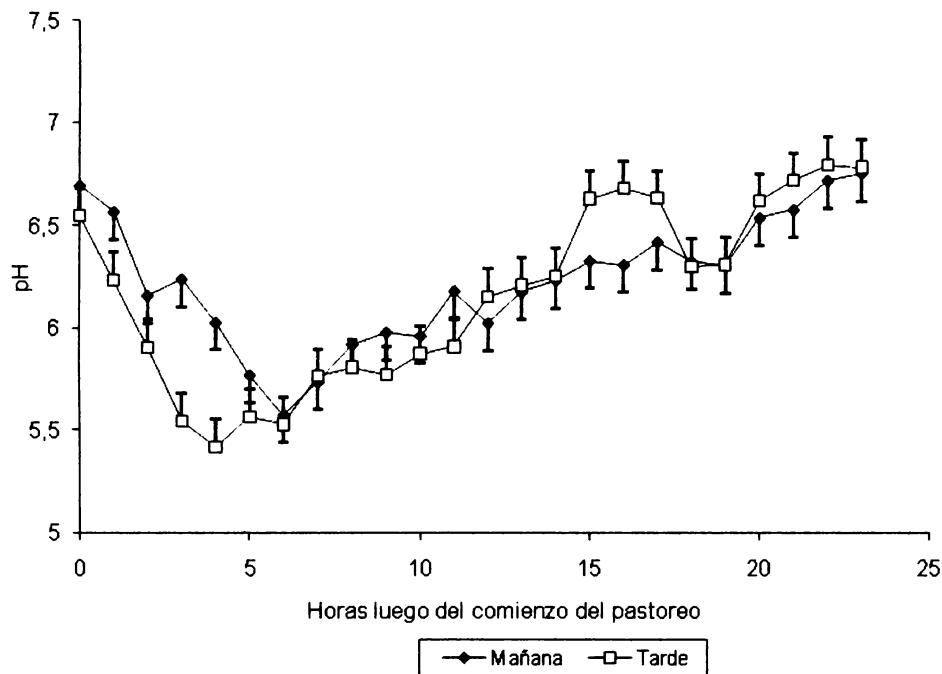


Figura 1. pH ruminal en vacas pastoreando de mañana o de tarde. Medias  $\pm$  error estándar (ES).

En la figura 1 se presentan graficados los valores de pH, observando que la interacción entre tratamiento y hora ( $t^*h$ ) no fue significativa. El valor de pH más bajo obtenido fue de 5,57 a las seis horas post prandial para el tratamiento M, y de 5,42 cuatro horas luego del comienzo de la ingesta para el tratamiento T. Mientras que los valores más altos de pH fueron de 6,76 a las 23 horas luego de la ingesta para el tratamiento M, y de 6,80 22 horas posteriores al comienzo del pastoreo para el tratamiento T.

Los valores promedio de pH obtenidos fueron de 6,20 y 6,16 para M y T respectivamente, observando que entre ellos las diferencias no fueron significativas. Dichos valores comienzan a descender una hora luego del principio de la ingesta y continúan descendiendo hasta la sexta hora postprandial, en ambos tratamientos (Ver figura 1). Debemos resaltar que el pH se mantiene en valores subóptimos ( $< 6,2$ ) durante 9 y 10 horas en los tratamientos M y T, respectivamente.

En cuanto a los valores de  $N-NH_3$  se obtuvieron los más bajos en los líquidos ruminales de vacas sometidas al tratamiento T (ver tabla III). Observándose que los efectos tratamiento, hora y la interacción entre ambos ( $t^*h$ ) dan diferencias significativas.

Para M el valor de  $N-NH_3$  más alto es de 29,01 mg/dl registrado cuatro horas luego del comienzo de la ingesta, mientras que para T fue de 22,11 mg/dl tres horas posprandial (valores máximos representados en Figura 2). Los valores más bajos

obtenidos fueron para M 6,77 mg/dl y para T 5,38 mg/dl, dieciocho y catorce horas luego del comienzo del pastoreo respectivamente.

En la Figura 2 se ven representados los valores de N-NH<sub>3</sub> obtenidos en los dos tratamientos.

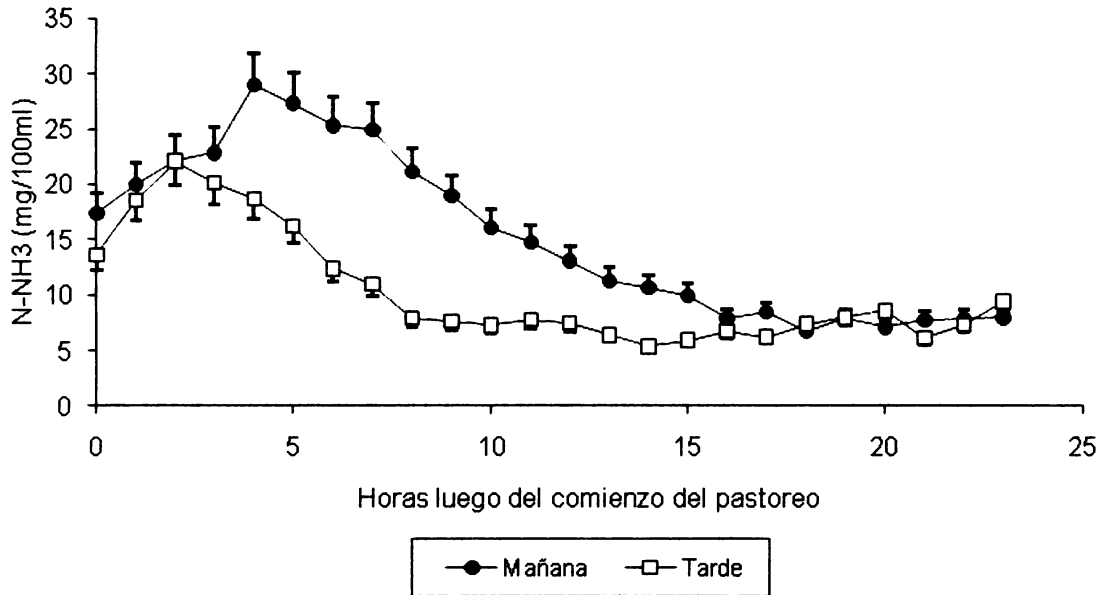


Figura 2. N-NH<sub>3</sub> ruminal en vacas pastoreando de mañana o de tarde. Medias ± error estándar (ES).

En los animales sometidos al tratamiento T se observó un importante descenso de N-NH<sub>3</sub> con valores que se mantuvieron a lo largo del día, casi en todas las horas, por debajo de los obtenidos de los animales en el tratamiento M.

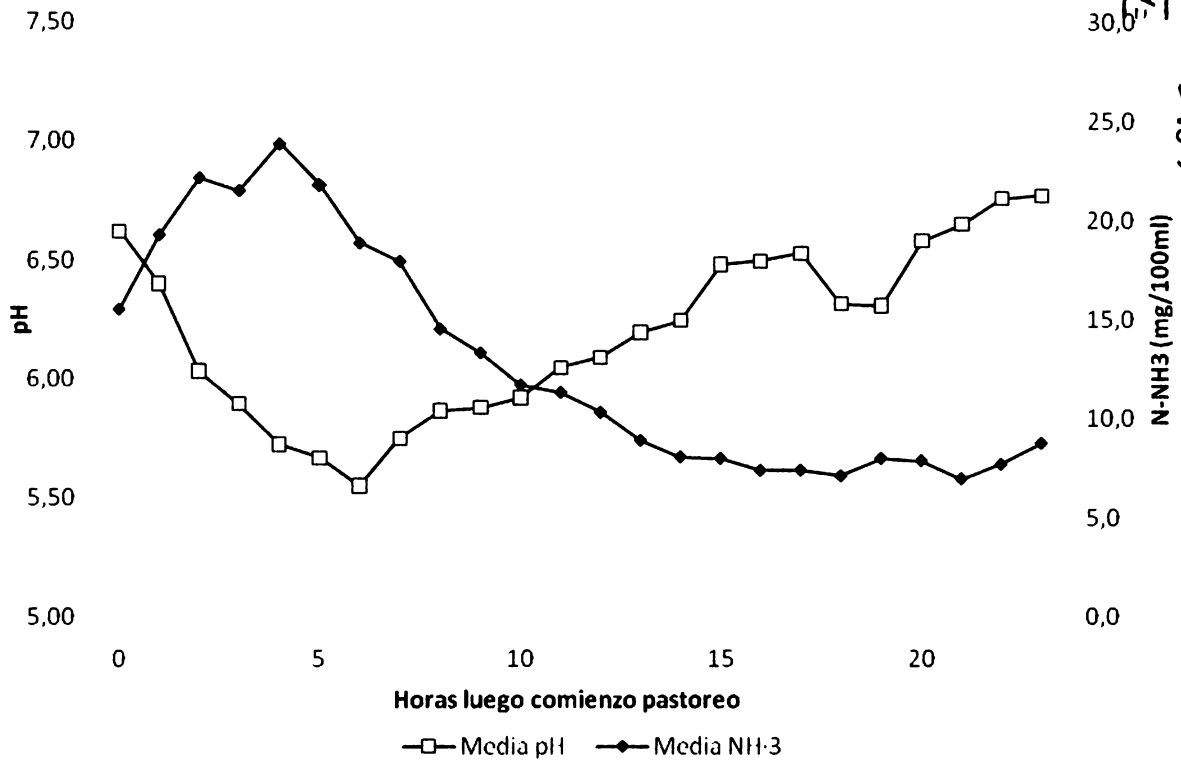


Figura 3. pH y N-NH<sub>3</sub> ruminal en vacas pastoreando de mañana y de tarde. Medias ± error estándar (ES).

En la Figura 3 comparamos las gráficas obtenidas con los valores medios de pH y amoníaco, observando que los dibujos de las mismas se presentan en forma de espejo. Luego del comienzo de la ingesta el pH empieza a descender mientras que el amoníaco aumenta, luego sucede a la inversa hasta que se cruzan en un punto (cercano a las 10 horas) donde el pH sigue su camino de aumento y el amoníaco descende.

### 8.3. DIGESTIBILIDAD IN VITRO

En la siguiente tabla encontramos los datos de IVTD representados como porcentaje de desaparición del sustrato.

**Tabla V. Digestibilidad in vitro (IVTD, %) de una colección de 12 alimentos incubados utilizando como inóculo líquido ruminal de los animales alimentados en la mañana (M) y en la tarde (T).**

Alimento	Tratamiento					
	M	T	ESM		P	
Alfalfa 1er corte 1er año	58,86	56,96				
Fardo de pradera malo	41,48	37,66				
Trébol rojo florecido	66,19	65,99				
Sorgo forrajero	70,41	70,49				
Chala de maíz	46,49	45,04				
Paspalum	65,45	62,64				
Alfalfa 1er año	68,19	69,02				
Lotus	79,39	79,18				
Trébol rojo vegetativo	71,08	71,90				
Gramilla	48,94	44,82				
Pulpa de limón	90,24	90,06				
Avena en grano	84,76	84,43				
			alim	trat	alim	trat
<b>Media Total</b>	65,96	64,85	0,31	0,052	<0,0001	0,032

*ES: error estándar, alim: efecto alimento, trat: efecto tratamiento (mañana vs. tarde)*

El rango de digestibilidad registrado fue muy amplio, el valor inferior encontrado fue de 37,66 % para el fardo de pradera malo incubado con líquido ruminal obtenido de vacas sometidas al tratamiento T. Por el contrario, la mayor digestibilidad fue para la pulpa de limón con un 90,24 % incubada con líquido ruminal obtenido de vacas sometidas al tratamiento M.

Analizando los datos se obtuvieron diferencias significativas con respecto a los efectos alimento y tratamiento, en promedio la IVTD fue significativamente menor en la tarde (P=0,032).

## **9. DISCUSIÓN**

### **9.1. CONTENIDO DE CARBOHIDRATOS SOLUBLES DE LA PASTURA**

Hay muchos factores, tales como el momento de corte, la duración del día, la temperatura y la madurez de la planta, y el modo de conservación del forraje, que pueden influir en la acumulación de azúcares en las plantas (Van Soest, 1994; Burns et al., 2007; Brito et al., 2008).

Similares resultados a los obtenidos en este trabajo, fueron descriptos por Repetto et al (2003b), donde se estudiaron las variaciones de CHOS, de N y la relación CHOS/N

en tres diferentes momentos del otoño. El contenido de CHOS aumentó significativamente durante el día, al contrario del N que mostró un descenso en sus valores, aunque la relación CHOS/N aumento en el correr del día. En otro ensayo, también realizado en nuestro país, Antúnez y Caramelli (2009) muestrearon 30 pasturas cortadas en diferentes horarios (9:00, 13:00 y 17:00 horas), encontraron contenidos de CHOS variables según la hora del día llegando a máximos valores a las 17:00 horas.

Brito et al. (2008) realizaron un ensayo en vacas lecheras en lactación, alimentadas con fardos de Alfalfa cortada al amanecer (AM, entre las 06.30 hs. y las 10.30 hs.) o cortada al atardecer (PM, entre las 18:30 hs. y las 21:45 hs.). La concentración de CHOS en los fardos PM fue 19% superior con respecto a los fardos AM.

## 9.2. pH

Según la hipótesis se esperaba un marcado descenso del pH debido al aumento en la disponibilidad ruminal de E dada por una mayor concentración de los CHOS en la pastura disponibles en la tarde. Sin embargo, a pesar de haber obtenido valores promedio de pH bajos, dicha diferencia esperada no fue observada. Esto pudo deberse al corto período de tiempo (4 horas) en el cual fueron alimentados nuestros animales, cantidad de alimento ingerido.

En contraposición a los resultados hallados, en dos ensayos realizados en paralelo al presente, se utilizaron 4 corderos y 4 terneras alimentados únicamente con pasturas templadas de buena calidad de mañana o de tarde. En corderos se registraron los valores de pH ruminal más bajos para el tratamiento T con diferencia significativa ( $P=0,001$ ) respecto a M. El pH se mantuvo por debajo de 6,2 durante 5 a 9 horas M y T respectivamente (Pérez, 2006). En terneras se constató una diferencia significativa en los valores de pH que fueron menores para T ( $P = 0,03$ ). Niveles de pH inferiores a 6,2 se registraron entre las 2 y 7 horas a partir de la ingesta (Cazzuli, 2010).

La administración de CHO, a través de la suplementación con granos a vacas lecheras a pastoreo, se ha relacionado con rápidas disminuciones en el pH ruminal (García et al., 2000). Cajarville et al (2006b) realizaron un trabajo en vacas lecheras consumiendo pasturas templadas de buena calidad y suplementadas con granos, midiendo, entre otros parámetros, la concentración de pH en el líquido ruminal extraído a cada hora durante 24 horas. Dicho parámetro fue menor cuando los animales fueron suplementados con granos con respecto al grupo control que solo consumieron pasturas (6,24 vs. 6,54,  $P < 0,001$ ), y el valor mínimo hallado fue de 5,86 cuatro horas luego de la suplementación. En nuestro trabajo se encontraron aún menores valores de pH (citados anteriormente), sin suplementación.

Por el contrario, en el trabajo de Brito et al. (2008), los valores de media diaria de pH ruminal fueron significativamente mayores en los animales que consumieron los fardos PM con respecto a los que ingirieron los fardos AM (6,41 y 6,34

respectivamente), a pesar de que ellos esperaban que un rápido aumento de los CHOS en el rumen, aportado por los fardos PM, redujera el pH ruminal.

Félix et al. (2011) realizaron un estudio en terneras alimentadas con pasturas templadas durante 4, 6, 8 y 24 horas al día, donde los valores de media diaria de pH fueron de 6,70, 6,64, 6,47 y 6,30 respectivamente. Estos concluyeron que la restricción en el tiempo de acceso al alimento influyó significativamente en la dinámica del pH del rumen. Similares resultados obtuvieron Pérez-Ruchel et al. (2009) en un ensayo realizado con ovinos estabulados o a pastoreo directo consumiendo pasturas templadas durante 6 horas al día. Los valores medios de pH ruminal fueron cercanos a la neutralidad. En el presente trabajo en el cual los animales comieron solamente durante 4 horas al día, los valores de pH hallados son muy inferiores a los citados anteriormente.

El pH está influenciado por varios factores, uno de ellos es la tasa de salivación (Taweel et al., 2005). Esta aumenta durante el consumo de alimentos y en la rumia (Church, 1988). Sauvant et al. (1999) demostraron la existencia de una relación negativa entre la velocidad de ingestión de alimentos y el pH. Así, los animales que ingieren alimentos en poco tiempo tienen un pH ruminal inferior. Pérez-Ruchel et al. (2009), observaron, en ovinos, que el tiempo de masticación total de los animales alimentados durante todo el día, fue 41 % superior con respecto a los que fueron alimentados durante seis horas ( $P < 0,001$ ). Por lo tanto, aquellos factores que provoquen la ingestión rápida de alimentos como la limitación en el tiempo de acceso a la comida, incrementarán la producción rápida de ácidos y el riesgo de acidosis (Díaz Plascencia, 2009).

El limitado tiempo dedicado a la alimentación podría llevar a una insuficiente producción de saliva y por consecuencia a un bajo ingreso de la misma al rumen. Esta podría haber sido una de las causas de los valores de pH tan bajos obtenidos en este ensayo, debido a una disminución en la producción de saliva como efecto buffer en el rumen.

### 9.3. NITRÓGENO AMONIACAL

Los valores en la concentración de  $N-NH_3$  en el líquido ruminal superaron, para los dos tratamientos y en ambos períodos experimentales, los niveles que se consideran limitantes para la síntesis de PM, entre 5 y 8 mg/ml según distintos autores (Satter & Slyter, 1974; Van Soest, 1994; Rearte y Santini 1989). Sin embargo, se hallaron valores significativamente inferiores en el tratamiento T con respecto al M.

Lee et al. (2002) realizaron un ensayo en ganado de carne alimentado con *Lolium perenne* con diferentes niveles de CHOS. El grupo de animales que consumió la pastura con altos niveles de CHOS obtuvo, en promedio diario, significativamente menores valores de  $N-NH_3$  ruminal comparado con el grupo control que se alimentó con la misma pastura pero con menores valores de CHOS (14,0 mg N/1 vs. 26,4 mg N/1 respectivamente). Según los autores, el descenso de  $N-NH_3$  indica que la



eficiencia en la utilización de éste por los mo del rumen fue mayor cuando tuvieron mayor disponibilidad de azúcares fermentables. Estos resultados, al igual que los obtenidos en nuestro trabajo, proporcionan evidencia de que un incremento en la sincronía entre la energía y la liberación de N en el rumen, puede ser alcanzado por la alimentación con pasturas con mayor concentración de la CHOS, lo cual mejoraría la síntesis de PM.

Sin embargo otros trabajos, no encontraron diferencias significativas en la concentración de amoníaco ruminal en animales alimentados en la mañana o en la tarde (Trevaskis et al.,2001; Pérez, 2006; Brito et al. 2008). Similares resultados fueron obtenidos por Aguerre et al. (2009) trabajando con ovejas consumiendo pasturas templadas y suplementadas con diferentes niveles de sorgo, encontraron altos niveles en la concentración de N-NH<sub>3</sub> tanto en el grupo control (que ingirió solo pastura) como en los grupos suplementados (> 35 mg/100ml). Sin embargo no hallaron diferencias significativas en dichos valores entre los distintos tratamientos.

En el trabajo de Cazzuli (2010) se observó una menor concentración de N-NH<sub>3</sub> en M vs. T (10,93 y 14,62 respectivamente), posiblemente debido al menor pH medio durante M.

Brito et al. (2009) alimentando vacas con silo de Alfalfa cortada de mañana (AM) o de tarde (PM), concluyeron que el consumo del silo PM estimuló la síntesis de proteína microbiana y la absorción de N-NH<sub>3</sub> por las bacterias del rumen. Esto sugiere que el aumento de la energía fermentable en rumen mejoró la capacidad de los microbios en la captura de N-NH<sub>3</sub> y su conversión en proteína microbiana (Brito et al., 2009).

El descenso en los valores de la concentración de N-NH<sub>3</sub> ruminal para el tratamiento T hallados en el presente estudio, pudo deberse a una mayor provisión de energía fácilmente fermentable al rumen, lo cual nos estaría indicando un mayor aprovechamiento de éste por parte de los mo para la síntesis de PM. Esto concuerda con lo citado por Hristov et al. (2005) quienes sugieren que la administración de energía fácilmente fermentable en rumen puede disminuir la concentración de N-NH<sub>3</sub> ruminal, lo cual produciría una mejoría en la captura del N-NH<sub>3</sub> destinado a la síntesis de PM. Esto coincide con el análisis de la pastura ofrecida en este trabajo, donde se observó un aumento en los CHOS por la tarde lo que llevó a un aumento también en la relación CHOS/N lo cual sugiere una sincronía en el aporte de ambos al rumen.

El descenso del ph puede modificar la absorción del N-NH<sub>3</sub> en el rumen. Esto pudo deberse a que una reducción en la población de bacterias celulolíticas y una menor digestibilidad de la fibra pudieron hacer descender los valores de N-NH<sub>3</sub> en el rumen.

## 9.4 Digestibilidad in vitro

Varios trabajos han reportado que la pastura al atardecer presenta una mayor digestibilidad de la materia seca in vitro (IVDMD) (Mayland et al., 1998; Fisher et al., 1999 y 2002; Burner and Belesky, 2004; Gregorini et al., 2006). El aumento de los CHOS en fardos de Alfalfa cortada de tarde produjo una reducción en la FDN, FDA, PC y nitratos. El aumento en la digestibilidad in vitro de la materia seca se atribuye a la disminución de la concentración de estos componentes, como también al aumento significativo de los CHONE a lo largo del día (Mayland et al., 2005).

Pérez (2010) comparó la potencia del inóculo mediante IVTD del líquido ruminal de ovejas a pastoreo continuo (todo el día) o pastoreo restringido (seis horas). El acceso al forraje durante todo el día habría aumentado la capacidad fermentativa lo cual podría indicar una mayor potencia de dicho inóculo para fermentar la fibra.

A pesar de que esperábamos que la IVTD aumentara en la tarde, debido a una mayor disponibilidad de energía para los mo del rumen (por aumento de los CHOS en la pastura de la tarde), esta presentó los valores más bajos para el tratamiento T con diferencia significativa respecto al tratamiento M. Esa diferencia fue más marcada en los alimentos más fibrosos y de menor digestibilidad, como el fardo de pradera de mala calidad y la gramilla.

Los resultados de digestibilidad in vitro obtenidos en el presente trabajo sugieren que pudo haber una menor actividad de las bacterias celulolíticas del inóculo de los animales que se alimentaron por la tarde, debido a la naturaleza fibrosa de los substratos utilizados.

Los efectos negativos sobre la fermentación microbiana ruminal con valores de pH por debajo de 6,2 están bien documentados. La digestibilidad de la fibra disminuye al aumentar el tiempo con valores de pH subóptimos (Cerrato-Sánchez et al., 2007). Cabe destacar que en este trabajo el pH se mantiene durante varias horas en valores subóptimos para una adecuada fermentación ruminal, lo cual posiblemente afectó a la flora celulolítica y en consecuencia a la degradación de la fibra.

Si bien no encontramos diferencias significativas en los valores promedio de pH entre tratamientos, cabe destacar que para T encontramos valores por hora más bajos y que durante 10 horas estos fueron menores de 6 hasta incluso llegar a valores de 5,5 durante 4 horas. Mientras que para M el período en el cual el pH estuvo por debajo de 6 fue menor (6 horas) y solo se registro en una hora un valor de 5,5. Esto podría haber llevado a una mayor muerte de flora celulolítica (o disminución de su actividad) en T con respecto a M y, de alguna manera, podría explicar la disminución de la digestibilidad de los alimentos sometidos a ese inóculo recogido de los animales sometidos al tratamiento T.

## **10. CONCLUSIONES**

Los valores de pH ruminal en bovinos con acceso restringido a pasturas templadas, no se hallaron diferencias significativas entre los tratamientos aplicados (mañana y tarde). Los valores promedio se encuentran en el límite inferior de los valores considerados óptimos para una correcta fermentación de los componentes fibrosos.

La concentración ruminal de N-NH<sub>3</sub> se mantuvo siempre en valores superiores a los requeridos para una buena síntesis de proteína microbiana. Fue significativamente menor en la tarde, lo cual nos estaría indicando un mayor aprovechamiento de éste por parte de los mo para la síntesis de PM.

Se produjo un descenso en la digestibilidad in vitro en los alimentos incubados con el inóculo de animales alimentados durante la tarde, lo que pudo deberse a una disminución de los mo celulolíticos presentes en el mismo.

## **11. BIBLIOGRAFÍA**

1. Aguerre, M. (2010). Suplementación con gran de sorgo a vaquillonas consumiendo una pastura templada: efecto sobre el consumo, el aprovechamiento digestivo y el metabolismo de la glucosa. Tesis de Maestría en nutrición de rumiantes. Universidad de la Republica, Facultad de Veterinaria. Montevideo, Uruguay. 45 p.
2. Aguerre M., Repetto J.L., Pérez-Ruchel A., Mendoza A., Pinacchio G., Cajarville C. (2009). Rumen pH and NH<sub>3</sub>-N concentration of sheep fed temperate pastures and supplemented or not with sorghum grain. *S Afr J Anim Sci* 39 (Supplement 1), p. 246-250.
3. Annison E.F., Lindsay D.B., Nolan J.V. (2002). Digestion and metabolism. En: Freer M., Dove H. (Eds.). *Sheep Nutrition*. Wallingford, CAB. p:95-118.
4. Antúnez, M., Caramelli, A. (2009). Variación en la composición química y producción de gas in vitro de pasturas de acuerdo al horario de corte. Tesis de grado. Universidad de la República, Facultad de Veterinaria. Montevideo, Uruguay. 43 p.
5. Brito, A.F., Tremblay G.F., Bertrand, A., Castonguay, Y., Bélanger, G., Michaud, R., Lapierre, H., Benchaar, C., Petit, H.V., Ouellet, D., Berthiaume, R. (2008). Alfalfa cut at sundown improves milk yield of late-lactation dairy cows. *J. Dairy Sci.* 91:3968–3982.
6. Brito, A.F., Tremblay G.F., Lapierre, H., Bertrand, A., Castonguay, Y., Bélanger, G., Michaud, R., Benchaar, C., Ouellet, D.R., Berthiaume, R. (2009). Alfalfa cut at sundown and harvested as baleage increases bacterial protein synthesis in late-lactation dairy cows. *J. Dairy Sci.* 92:1092-1107.
7. Burner, D.M., Belesky, D.P. (2004). Diurnal effects on nutritive value of alley-cropped orchardgrass herbage. *Crop Sci.* 44:1776-1780.
8. Burns, J.C., Fisher, D.S., Mayland, H.F. (2007). Diurnal shifts in nutritive value of alfalfa harvested as hay and evaluated by animal intake and digestion. *Crop Sci.* 47:2190–2197.
9. Cajarville C., Curbelo 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.
10. Cajarville C., Pérez A., Aguerre M., Britos A., Repetto J.L. (2006a). Effect of the timing of cut on ruminal environment of lambs consuming temperate pastures. *J. Anim. Sci. Abst.* 84 / *J. Dairy. Sci. Abst.* 89.
11. Cajarville C., Aguerre M., Repetto J. (2006b). Rumen pH, NH<sub>3</sub>-N concentration and forage degradation kinetics of cows grazing temperate pastures and supplemented with different sources of grain. *Anim Res* 55:511–520.

12. Cajarville C., Britos A., Caramelli, A., Antúnez, M., Zanoniani R., Boggiano P., Repetto J.L. (2007). El horario de corte y el tipo de metabolismo fotosintético afectan la relación azúcares/nitrógeno de las pasturas. Arch. Latinoam. Prod. Anim. Vol. 15 (Supl.1):408-409.
13. Calsamiglia, S. (1997). Nuevas bases para la utilización de fibra en dietas de ruminantes. XIII Curso de especialización FEDNA. Madrid, España. 18p.
14. Cazzuli G., Repetto J.L., Pérez A., Britos A., Aguerre M., Garín D., Cajarville C. (2007). Dinámica de pH y N-NH<sub>3</sub> en terneras alimentadas con pastura templada en horarios restringidos. Proc. XXXV Jornadas Uruguayas de Buiatría, Paysandú, Uruguay. p.338-339.
15. Cazzuli, G. (2010). Ambiente ruminal y producción de proteína microbiana en terneras según el horario de corte de la pastura consumida. Tesis de grado. Universidad de la República, Facultad de Veterinaria. Montevideo, Uruguay. 29p.
16. Cerrato-Sánchez, M., Calsamiglia, S., Ferret, A. (2007). Effect of the magnitude of the decrease of rumen pH on rumen fermentation in a dual-flow continuous culture system. J. Anim. Sci. 86:378-383.
17. Church, C.D. (1988). Función y producción de saliva. En: Church, C.D. El Rumiante: Fisiología digestiva y Nutrición. Zaragoza, Acribia. p.127-135.
18. Ciavarella, T.A., Simpson, R.J., Dove, H., Leury, B.J., Sims, I.M. (2000). Diurnal changes in the concentration of water-soluble carbohydrates in *Phalaris aquatica* L. pasture in spring, and the effect of short-term shading. Aust. J. Agric. Res. 84: 49-68.
19. De Veth, M. J., Kolver E.S. (2001a). Digestion of Ryegrass Pasture in Response to Change in pH in Continuous Culture. J. Dairy. Sci. 84: 1449-1457.
20. De Veth, M. J., Kolver E.S. (2001b). Diurnal Variation in pH Reduces Digestion and Synthesis of Microbial Protein when Pasture is fermented in Continuous Culture. J. Dairy. Sci. 84: 2066-2072.
21. Díaz Plascencia, D. (2009). Acidosis ruminal en la alimentación de los rumiantes. Funciones y Disfunciones Metabólicas. Chihuahua, Universidad Autónoma de Chihuahua. 54p.
22. Fahey, G.C. Jr., Berger, L.L. (1988). Los carbohidratos en la nutrición de los rumiantes. En: Church, C.D. El Rumiante: Fisiología digestiva y Nutrición. Zaragoza, Acribia. p.305-337.
23. Félix, A., Hernández, N., Figueredo, N., Génova, M., Ibarra, M., Mendoza, A., Aguerre, M., Pérez-Ruchel, A., Repetto, J.L., Cajarville, C. (2011). The time of access to temperate pasture influences rumen pH and NH<sub>3</sub>-N concentration in heifers. J. Anim. Sci. 89, E-Suppl. 1/J. Dairy Sci. 94, E-Suppl. 1, p.379-380.

24. Fisher, D.S., Mayland, H.F., Burns, J.C. (1999). Variation on ruminant's preference for tall fescue hays cut either at sundown or at sunup. *J. Anim. Sci.* 77: 762-768.
25. Fisher, D.S., Henry, F., Mayland, H.F., Burns, J.C. (2002). Variation in ruminant preference for alfalfa hays cut at sunup and sundown. *Crop Sci.* 42: 231-237.
26. García, S.C., Santini, F.J., Elizalde, J.C. (2000). Nutrition, feeding, and calves. Sites of digestion and bacterial protein synthesis with or without corn or barley grain. *J Dairy Sci.* 83:746-755.
27. Gregorini, P., Eirin, M., Refi, R., Ursino, M., Ansin, O.E., Gunter, S.A. (2006). Timing of herbage allocation in strip grazing: effects on grazing pattern and performance of beef heifers. *J. Anim. Sci.* 84:1943-1950.
28. Hess, B.W., Krysl, L.J., Judkins, M.B., Holcombe, D.W., Hess, J.D., Hanks, D.R., Huber, S.A. (1996). Supplemental Cracked Corn or Wheat Bran for Steers Grazing Endophyte-Free Fescue Pasture: Effects on Live Weight Gain, Nutrient Quality, Forage Intake Particulate and Fluid Kinetics, Ruminal Fermentation, and Digestion. *J. Anim. Sci.* 74:1116-1125.
29. 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.
30. Lee, M.R.F., Harris, L. J., Moorby, J. M., Humphreys, M.O., Theodorou, M. K., MacRae, J.C., Scollan, N. D. (2002). Rumen metabolism and nitrogen flow to the small intestine in steers offered *Lolium perenne* containing different levels of water-soluble carbohydrate. *Anim. Sci.* 74:587-596.
31. Mayland, H.F., Shewmaker, G.E., Burns, J.C., Fisher, D.S. (1998). Morning and evening harvest effects on animal performance. *California Alfalfa Symposium*, 3-4 Dic. Reno, NV, UC Cooperative extension, University of California. p. 26-30.
32. Mayland, H., Gregorini, P., Mertens, D.R., Taylor, J.B., Burns, J.C., Fisher, D.S., Ciavarella, T., Smith, K., Shewmaker, G., Griggs, T. (2005). Diurnal changes in forage quality and their effects on animal preference, intake, and performance. *Proceedings of the 35th California Alfalfa & Forage Symposium*. Visalia, California. U.S.A. p. 223-230.
33. McDonald, P., Edwards, R.A., Greenhalgh, J.F.D., Morgan, CA. (2002). *Nutrición Animal*. 6ª. ed. Zaragoza, España. Acribia. p. 587.
34. Mehrez A. Z., Ørskov E. R., McDonald I. (1977). Rates of rumen fermentation in relation to ammonia concentration. *Br J Nutr* 38:437-443.
35. Merchen N.R. (1988) Digestión, absorción y excreción en los rumiantes. En: Church, C.D. *El Rumiante: Fisiología digestiva y Nutrición*. Zaragoza, Acribia. p.191-223.

36. Mertens, D. R. (1997). Creating a system for meeting the fiber requirements of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 80:1463–1481.
37. Moshtaghi, S.A., Ingalls, J.R. (1995). Influence of moist heat treatment on ruminal and intestinal disappearance of amino acids from canola meal. *J. Dairy Sci.* 78 (7):1552-1560.
38. Nápoli G.M., Santini F.J., (1988a). Suplementación energético-proteica de forrajes frescos en condiciones de pastoreo: I. Efecto sobre el medio ambiente ruminal y la degradabilidad proteica. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 8, Sup.1:39.
39. Nápoli G.M., Santini F.J., (1988b). Suplementación energético-proteica de forrajes frescos en condiciones de pastoreo:II. Efecto sobre la cinética de la digestión ruminal de la fibra. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 8, Sup.1:40.
40. Owens F.N. y Goetsch A.L., (1988) Fermentación ruminal. En: Church, C.D. *El Rumiante: Fisiología digestiva y Nutrición*. Zaragoza, Acribia. p.159-189.
41. 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. Universidad de la República, Facultad de Veterinaria. Montevideo, Uruguay. 44 p.
42. Pérez-Ruchel, A., Repetto, J.L., Sanguinetti, F., Cajarville, C. (2009). Comportamiento ingestivo y digestibilidad en rumiantes según el tiempo de acceso al forraje. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 29:287-287.
43. Pérez, A. (2010). Tiempo y forma de acceso al forraje y uso de buffers o levaduras: efecto sobre el aprovechamiento digestivo de la dieta en ovinos. Tesis de Maestría en nutrición de rumiantes. Universidad de la Republica, Facultad de Veterinaria. Montevideo, Uruguay, 100 p.
44. Rearte, D. H., Santini, F. J. (1989). Digestión ruminal y producción de animales en pastoreo. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 9:93-105.
45. Repetto, J.L., Aguerre, M., Alonso, M., Curbelo, A., Errandonea, N., Cajarville, C. (2001). Concentración de amoníaco ruminal en vacas en pastoreo, suplementadas con diferentes granos. VII Congreso Nacional de Veterinaria. Montevideo, Uruguay. CD-ROM.
46. Repetto, J.L, Cajarville, C., D'Alessandro, J., Curbelo, A., Soto, C., Garin, D. (2005). Effect of wilting and ensiling on ruminal degradability of temperate grass and legume mixture. *Anim. Res.* 54:1-8.
47. Repetto, J.L., Errandonea, N., Britos, A., Cozzolino, D., Cajarville, C. (2003a). Changes in water soluble carbohydrate contents during the day in Lucern and Fescue cut in autumn. *Proceedings of the British Society of Anim Sci*, York, UK, p.176.

48. Repetto, J.L., Britos, A., Cozzolino, D., Errandonea, N., Cajarville, C., (2003b). Nutritive value of Lucern and Fescue during autumn I: relationship between water soluble carbohydrates and nitrogen contents throughout the day. Proceedings of the IX World Conference on Animal Production, Porto Alegre, Brasil. p.26.
49. Rooke, J.A., Lee N.H., Armstrong, D.G. (1987). The effect of intraruminal infusions of urea, casein, glucose syrup, and a mixture of casein and glucose syrup on nitrogen digestion in the rumen of cattle receiving grass silage diets. *Br. J. Nutr.* 57:89-98.
50. Russell, J. B., Wilson, D. B. (1996). Why Are Ruminal Cellulolytic Bacteria Unable to Digest Cellulose at Low pH? *J. Dairy Sci.* 79:1503-1509.
51. Santini, F.J., Elizalde, I.C. (1994). Digestión ruminal aspectos conceptuales e implicancias practicas. *Crea, Suplementación de vacunos, Cuaderno de Actualización Técnica.* 53:10-16.
52. Satter, L.D., Slyter, L.L. (1974). Effect of ammonia concentration on rumen microbial protein production in vitro. *Br J Nutr.* 32:199-208.
53. Sauvant, D., Meschy, F., Mertens, D. (1999). Les composantes de l'acidose ruminale et les effects acidogenes des rations. *INRA. Prod. Anim.* 12:49-60.
54. Shriver B.J., Hoover W.H., Sargent J.P., Crawford R.J., Thayne W.V. (1986). Fermentation of a high concentrate diet as affected by ruminal pH and digesta flow. *J Dairy Sci.* 69:413-419.
55. Taweel, H. Z., Tas, B. M., Smith, H. J., Elgersma, A., Dijkstra, J., Tamminga, S. (2005). Effects of feeding perennial ryegrass with an elevated concentration of water-soluble carbohydrates on intake, rumen function and performance of dairy cows. *Anim. Feed Sci. Technol.* 121:243-256.
56. Tebot, I., Britos, A., Godeau, J.M., Cirio A. (2002). Microbial protein production determined by urinary allantoin and renal urea aparing in normal and low protein fed Corriedale Sheep. *Vet. Res.* 33:101-106.
57. 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. *Aust. J. Exp. Agric.* 41:21-27.
58. Van Soest P.J. (1994). *Nutritional ecology of the ruminant.* 2a. ed., Ithaca, Ed. Cornell University Press, 476p.
59. Yemm E. W., Willis A. J. (1954). The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. *Biochem J.* 57:508.