UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

RESTRICCIÓN DEL TIEMPO DE ACCESO A UN FORRAJE FRESCO EN TERNERAS: EFECTO SOBRE EL AMBIENTE RUMINAL Y LA SÍNTESIS DE PROTEÍNA MICROBIANA

Por

FIGUEREDO, Nicolás
GÉNOVA, Matías
IBARRA, Manuel

TESIS DE GRADO presentada como uno de los requisitos para obtener el título de Doctor en Ciencias Veterinarias (Orientación Producción Animal, Bloque Rumiantes, y Orientación Higiene, Inspección-control y Tecnología de los Alimentos de Origen Animal.)

MODALIDAD Ensayo Experimental

MONTEVIDEO
URUGUAY
2014

PÁGINA DE APROBACIÓN

Tesis de grado aprobada por:

Presidente de mesa: _____
Dra. Islamey Tebot.

Segundo miembro (Tutor): _____
DCV MSc. Alicia Félix

Tercer miembro: _____
Dr. Alejandro Britos

Cuarto miembro (Co-tutor): _____
DMTV PhD. Cecilia Cajarville

Fecha: 19/12/2014

Autores: _____
Br. Nicolás Figueredo

Autores: _____
Br. Matías Génova

Autores: _____
Br. Manuel Ibarra

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 las Dras. Alicia Félix, Natalia Hernández y Cecilia Cajarville por su tutoría y cotutoría y el respaldo depositado en nosotros.

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

A todos los integrantes del Departamento de Bovinos de la Facultad de Veterinaria, especialmente a José Luis Repetto, Martín Aguerre, y Alejandro Mendoza por su ayuda en el trabajo de campo.

A los Brs. con los que compartimos el ensayo experimental.

Al personal del campo experimental Nº 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
PÁGINA DE APROBACIÓN	II
AGRADECIMIENTOS	III
LISTA DE CUADROS Y FIGURAS	6
LISTA DE ABREVIATURAS	7
RESUMEN	9
ABSTRACT	10
INTRODUCCIÓN	11
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	13
• LAS PASTURAS TEMPLADAS EN LA ALIMENTACIÓN DE RUMIANTES	13
• AMBIENTE RUMINAL	14
• PH	14
• NITRÓGENO AMINIACAL ($N\text{-}NH_3$)	16
• PRODUCCIÓN DE PROTEÍNA MICROBIANA	17
• RESTRICCIÓN DEL TIEMPO DE ACCESO A LA PASTURA	18
• EFECTO SOBRE AL AMBIENTE RUMINAL	19
• EFECTO SOBRE LA SÍNTESIS DE PROTEÍNA MICROBIANA	20
HIPÓTESIS	22
OBJETIVO GENERAL	22
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
MATERIALES Y MÉTODOS	23
• ANIMALES Y DISEÑO EXPERIMENTAL	23

- TRATAMIENTOS 23
- ALIMENTOS Y MANEJO 23
- DETERMINACIÓN Y CÁLCULOS 24
    - AMBIENTE RUMINAL 24
    - SÍNTESIS DE PROTEÍNA MICROBIANA 24
- ANÁLISIS ESTADÍSTICO 25

RESULTADOS 26

- AMBIENTE RUMINAL 26
- SÍNTESIS DE PROTEÍNA MICROBIANA 26

DISCUSIÓN 29

CONCLUSIONES 32

BIBLIOGRAFÍA 33

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

Página

Cuadro I. Composición química promedio de la pastura (% en base seca) utilizada durante el período experimental. 24

Cuadro II. Valores promedio de pH y de concentración de N-NH_3 (mg/dL) ruminal en terneras con diferente tiempo de acceso al forraje fresco. 27

Cuadro III. Síntesis de proteína microbiana y su eficiencia en terneras con diferente tiempo de acceso al forraje fresco 28

Figura 1. Dinámica del pH ruminal en terneras con diferente tiempo de acceso al forraje fresco 27

Figura 2. Dinámica de la concentración de N-NH_3 ruminal en terneras con diferente tiempo de acceso al forraje fresco 28

LISTA DE ABREVIATURAS

AGV: ácidos grasos volátiles

CH: carbohidratos

CHEA: comisión honoraria de experimentación animal

EEM: error estándar de la media

ESPM: eficiencia de síntesis de proteína microbiana

EUN: eficiencia de uso del nitrógeno

FAD: fibra ácido detergente

FND: fibra neutro detergente

mo: microorganismos

MO: materia orgánica

MOAF: materia orgánica aparentemente fermentada en rumen

MODI: materia orgánica digestible ingerida

MS: materia seca

N: nitrógeno

NH_3: amoníaco

Ni: nitrógeno ingerido

Nmo: nitrógeno microbiano

$N\text{-}NH_3$: nitrógeno amoniacal

P: probabilidad del efecto del tratamiento

PB: proteína bruta

PV: peso vivo

SPM: síntesis de proteína microbiana

T24: tratamiento 24 horas diarias de acceso al forraje

T4: tratamiento 4 horas diarias de acceso al forraje

T6: tratamiento 6 horas diarias de acceso al forraje

T8: tratamiento 8 horas diarias de acceso al forraje

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la restricción en el tiempo de acceso al alimento sobre el ambiente ruminal y la síntesis de proteína microbiana en terneras alimentadas con un forraje fresco de alta calidad. Para este experimento se utilizaron 24 terneras cruza Hereford x Angus de 153,0 ± 18,1 kg de peso, las cuales fueron alojadas en jaulas metabólicas. Los animales fueron distribuidos según un diseño de bloques completos al azar en los siguientes cuatro tratamientos: 4, 6, 8 o 24 horas diarias de acceso al forraje (T4, T6, T8 y T24 o control, respectivamente). La pastura (*Lolium multiflorum* y *Trifolium repens*) fue cortada diariamente y ofrecida a los animales (sin restricción de cantidad), como único alimento durante el tiempo establecido para cada tratamiento. Se colectó orina para estimar la síntesis de proteína microbiana y se extrajo líquido ruminal para la determinación de los valores de pH y las concentraciones de $N\text{-}NH_3$. Los resultados de pH y $N\text{-}NH_3$ ruminal fueron analizados como medidas repetidas en el tiempo con un modelo lineal mixto, mientras que la síntesis de proteína microbiana se analizó con un modelo lineal general. El pH y la concentración de $N\text{-}NH_3$ a nivel de rumen fueron afectados por el tratamiento, la hora y la interacción tratamiento x hora. La restricción del tiempo de acceso al forraje generó valores de pH y concentraciones de $N\text{-}NH_3$ más fluctuantes a lo largo del día ($P < 0,001$) respecto a los animales sin restricción (T24). Los valores promedio de pH de los grupos más restringidos (T4 y T6) fueron más altos que los del grupo control (6,70; 6,64 y 6,30 ± 0,07 para T4, T6 y T24, respectivamente, $P < 0,001$). Por el contrario, las concentraciones promedio de $N\text{-}NH_3$ para los grupos más restringidos (T4 y T6) fueron menores respecto al control (26,7; 26,5 y 30,7 ± 1,0 mg/dL para T4, T6 y T24, respectivamente, $P < 0,05$). La síntesis de proteína microbiana tendió a ser mayor en los animales sin restricción ($P = 0,07$), sin embargo su eficiencia no fue afectada por la restricción en el tiempo de acceso al forraje ($P > 0,20$). Se concluyó que restringir el tiempo de acceso al alimento en terneras generó un ambiente ruminal más variable sin afectar la eficiencia de síntesis de proteína microbiana.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effect of restricting the access time to feed on rumen environment and microbial protein synthesis in calves fed fresh high quality forage. For this experiment we used 24 Hereford x Angus cross calves of 153.0 ± 18.1 kg, which were housed in metabolic cages. The animals were distributed according to a block design completely randomized into the following four treatments: 4, 6, 8 or 24 hours a day access to forage (T4, T6, T8 and T24 or control, respectively). The pasture (*Lolium multiflorum* and *Trifolium repens*) was cut daily and offered to animals (no quantity restriction), as the only food for the set time for each treatment. Urine was collected for estimating microbial protein synthesis and ruminal fluid for determination of pH values and concentrations of NH_3-N was extracted. pH and ruminal NH_3-N results were analyzed as repeated measures in time with a linear mixed model, while microbial protein synthesis was analyzed with a general linear model. The pH and the concentration of N-NH_3 ruminal were affected by treatment, time and time x treatment interaction. Restricting access time to forage generated pH and concentrations of N-NH_3 more fluctuating throughout the day (P <0.001) compared to animals without restriction (T24). The average values of pH of the more restricted groups (T4 and T6) were higher than the control (6.70, 6.64 and 6.30 ± 0.07 for T4, T6 and T24, respectively, P < 0.001). By contrast, the average of N-NH_3 concentrations for more restricted groups (T4 and T6) were lower compared to the control (26.7, 26.5 and 30.7 ± 1.0mg/dL for T4, T6 and T24, respectively, P <0.05). The microbial protein synthesis tended to be higher in animals without restriction (P = 0.07), but its efficiency was not affected by the restriction in access time to forage (P > 0.20). It was concluded that restrict access time feed in calves produced a more variable rumen environment without affecting the efficiency of microbial protein synthesis.

INTRODUCCIÓN

En Uruguay, los sistemas de producción de rumiantes son esencialmente pastoriles debido a las condiciones muy favorables para la producción de forrajes que posee nuestro país. Los sistemas semi-intensivos de producción de carne y leche generalmente utilizan pasturas templadas de buena calidad como parte fundamental de la dieta, que son cosechadas por los animales mediante pastoreo directo constituyendo éste el recurso alimenticio con mejor relación costo/beneficio. Las especies forrajeras que se utilizan en dichos sistemas de nuestro país están representadas principalmente por gramíneas C3, leguminosas y sus mezclas (Repetto y Cajarville, 2009). Estas pasturas en estado vegetativo son alimentos de alta calidad y proporcionan al rumiante cantidades importantes de nutrientes que son casi totalmente aprovechados en el rumen (Cajarville y Repetto, 2005).

Los rumiantes son capaces de utilizar los forrajes y acceder a la energía contenida en sus carbohidratos, tanto estructurales como solubles y de reserva, gracias a la fermentación microbiana de los alimentos en el rumen. El retículo-rumen es el compartimento fermentativo de mayor tamaño en los rumiantes, y mantiene en su interior determinadas condiciones de anaerobiosis, temperatura y humedad que lo hacen una cámara adecuada para la fermentación (Russell y Hespell, 1981). A su vez, en él se desarrolla un complejo ecosistema microbiano, cuyas enzimas son las principales responsables de la degradación de los alimentos. La flora microbiana que pasa junto al bolo alimenticio a las partes posteriores del tracto digestivo constituye el mayor aporte de proteínas para el animal, pudiendo representar hasta el 60 % del total de aminoácidos que ingresan al duodeno (Clark y col., 1992). Por lo tanto, un óptimo ambiente ruminal, que favorezca la actividad microbiana, podría maximizar tanto la degradación de los alimentos como la eficiencia de síntesis microbiana y por ende el aporte de proteína a los rumiantes (Rearte y Santini, 1989).

Cada microorganismo posee un rango de pH óptimo para desarrollarse; siendo el rango de pH de desarrollo de la flora normal del rumen entre 5,5 y 6,9 (Relling y Mattioli, 2003). Satter y Slyter (1974) señalan que el nivel mínimo de $N\text{-}NH_3$ ruminal para un adecuado crecimiento microbiano es de 5 mg/dL. Trabajos realizados en el Departamento de Nutrición Animal de la Facultad de Veterinaria (Uruguay) muestran que, el ambiente ruminal de animales consumiendo praderas templadas de alta calidad puede ser diferente de lo que se considera un ambiente ruminal óptimo, con valores de pH inferiores a los recomendables (Cajarville y col., 2000). Dichos trabajos reflejan además, niveles ruminales de $N\text{-}NH_3$ elevados (20,1 mg/dL o mayores) que por lo tanto no serían limitantes para el crecimiento microbiano (Repetto y col., 2001).

Aunque la calidad del forraje es muy elevada, la cantidad de que se dispone en ciertas épocas del año puede ser limitante (Pérez-Ruchel, 2010). La restricción del tiempo de acceso a este tipo de pasturas aparece como una herramienta que permitiría hacer un uso eficiente de la misma, evitando problemas por sobre-pastoreo y destrucción del forraje por pisoteo (Chilibroste y col., 2007).

Algunos trabajos realizados a nivel nacional en vacas lecheras (Chilibroste y col., 2007) y en ovinos (Pérez-Ruchel, 2010) evaluando el efecto del tiempo de acceso al

alimento sobre el consumo, el comportamiento y el ambiente ruminal permiten ver que los efectos de la restricción en el tiempo de acceso al forraje dependen entre otros factores de la severidad y duración de la misma. Chilibroste y col. (2007), trabajando con vacas lecheras reportaron un aumento en la tasa de consumo y en la proporción del tiempo efectivo de pastoreo como mecanismos adaptativos frente a la restricción, que al disminuir de 16 a 8 h/día les permitió a los animales mantener los niveles de consumo, pero que no fueron suficientes frente a restricciones más severas (restricción de 8 a 4 h/día). Pérez-Ruchel (2010) también observó un aumento en la tasa de consumo en ovinos cuyo tiempo de acceso al forraje fue restringido a 6 h/día, sin embargo, los mismos no lograron mantener los niveles de consumo alcanzados por los animales sin restricción.

La restricción en el tiempo de acceso al alimento conduce a un mayor período de ayuno, lo que hace que al finalizar el mismo los animales ingieran el alimento ofrecido con una mayor voracidad (Forbes y Mayes, 2002). Teóricamente, estas mayores tasas de consumo provocarían una alta tasa de fermentación a nivel ruminal generando elevadas producciones de ácidos grasos volátiles (AGV) y N-NH_3, que conducirían a una disminución del pH ruminal (Cajarville y Repetto, 2005). Estos menores valores de pH pueden afectar negativamente la actividad de la

AMBIENTE RUMINAL

Los rumiantes se caracterizan por su capacidad para alimentarse de forraje, gracias a que en su sistema digestivo se pueden degradar los CH estructurales del mismo, como son la celulosa y la hemicelulosa, muy poco digestibles para la mayoría de las especies de estómago simple o no-rumiantes (Relling y Mattioli, 2003). El estómago de los rumiantes comprende cuatro compartimientos: rumen, retículo, omaso y abomaso; de los cuales sólo el último produce enzimas digestivas capaces de degradar alimentos (Phillipson, 1981). El mayor aporte de nutrientes de los forrajes está constituido por polisacáridos unidos por enlaces de tipo ß1-4 no susceptibles a hidrólisis por las enzimas secretadas por el rumiante en los sectores posteriores del tracto gastrointestinal. Sin embargo, en los dos primeros compartimentos del estómago se producen procesos de fermentación que son realizados por los mo (protozoarios, hongos y bacterias) que ahí habitan cuyas enzimas pueden desdoblar enlaces ß1-4 (Lovett y col., 2006).

Por lo tanto, en el sistema digestivo de los rumiantes altamente especializado se destaca la presencia del retículo-rumen con alta capacidad de almacenamiento y mezclado, lo que disminuye la velocidad de pasaje del alimento a través del tracto digestivo (Chilibroste, 2002) y constituye un ecosistema abierto y continuo que proporciona un ambiente ideal para el mantenimiento de una población microbiana muy diversa (Yokoyama y Johnson, 1993). En rumiantes, el 90% de las paredes celulares potencialmete digestibles de las pasturas, se digieren a este nivel (Sauvant y col., 1995), y el resultado neto de la acción de los mo sobre el forraje, es la síntesis de nuevos compuestos, los AGV (Chilibroste, 2002). Los AGV con número par de carbonos (C2 y C4) pueden ser usados como fuente energética directa en cualquier tejido, ingresando como acetil-CoA al ciclo de Krebs, o bien ser empleados para sintetizar ácidos grasos, por lo cual se los considera lipogénicos, mientras que el propionato posee un destino completamente distinto, ya que puede ser convertido en glucosa, por esta razón se lo considera glucogénico (Relling y Mattioli, 2003). Por esto, la cantidad y tipo de nutrientes absorbidos por los rumiantes, y la respuesta productiva del animal dependerá en gran medida de lo que ocurra a este nivel. Así, el conocimiento de los factores que alteran las condiciones físicas o el equilibrio químico del rumen es muy importante, porque puede permitir mejorar las condiciones de producción y el rendimiento de los animales (Araujo y Vergara, 2007). Algunos parámetros fundamentales en la determinación del ambiente ruminal son los valores de pH, y las concentraciones de $N\text{-}NH_3$ y AGV a lo largo del día.

- pH

El pH ruminal es uno de los principales parámetros ruminales que afecta directamente al crecimiento microbiano, determinando el tipo de mo que crece a nivel ruminal y, en consecuencia, influye fuertemente en la fermentación ruminal (Pereira y col., 2007). Cuando los rumiantes ingieren forrajes, la flora microbiana ruminal que se desarrolla es principalmente celulolítica. Si bien la mayoría de los mo ruminales están adaptados a 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 y col., 2007), y según

Van Soest (1994), el pH ruminal de los animales a pastoreo se encuentra cercano a este óptimo (6,7 ± 0,5).

Para mantener su pH dentro de valores fisiológicos normales los rumiantes poseen un sistema altamente desarrollado (Krause y Oetzel, 2006). En el retículo-rumen el pH es producto de la interacción entre: la producción y la absorción de AGV, el ingreso de sustancias buffer a través de la saliva producida durante la rumia, el nivel de ingesta de alimento y de pasaje de la digesta hacia los tramos posteriores del tracto digestivo, y el ingreso de bicarbonato al rumen a través del epitelio ruminal (Wheeler, 1980). Las interacciones entre los tres sistemas buffer (el del bicarbonato, el de los fosfatos y el de los AGV) permiten mantener el pH dentro de los valores fisiológicos.

La saliva secretada por el rumiante actúa como lubricante del alimento durante su ingestión pero fundamentalmente durante su rumia. La misma tiene un pH promedio de 8,2, dado por su alto contenido de sodio, potasio, bicarbonato y fosfato, características que le permiten su acción buffer en el líquido ruminal (Krause y Oetzel, 2006). La gran cantidad de saliva producida diariamente por el rumiante (48 L o 15-21% del peso corporal (Owens y Goetsch, 1988)), aporta aproximadamente la mitad del bicarbonato que entra en el rumen (Owens y col*.,* 1998), y por lo tanto constituye un regulador fundamental del pH ruminal (Rearte y Santini, 1989). La secreción de saliva es estimulada por la ingestión de alimento y por la rumia (Krause y Oetzel, 2006), siendo la fibra larga quien estimula esta última, mientras que la fibra corta es capaz de pasar por el orificio retículo-omasal más rápidamente, sin necesidad de la acción mecánica de la rumia sobre ella (Araujo y Vergara, 2007). Otro factor que influye en la cantidad de saliva secretada con el alimento es la humedad del mismo, cuanto más húmedo menos saliva se secreta, y por lo tanto, menos sales alcalinas entran al rumen (Araujo y Vergara, 2007).

Es bien conocido el rol que cumplen los AGV en la reducción del pH ruminal, alcanzando éste los valores mínimos alrededor de las 4 h luego de la ingesta (Church, 1993), coincidiendo con las mayores producciones de AGV. La absorción de los mismos a nivel ruminal es otro mecanismo que ayuda a mantener el pH en valores fisiológicos, y se produce pasivamente a través de las papilas que constituyen una gran superficie de absorción en la pared ruminal (Krause y Oetzel, 2006). Los AGV luego de ser absorbidos son los principales proveedores de energía para los procesos metabólicos de los rumiantes (Voelker y Allen, 2003).

En algunas ocasiones, los productos ácidos de la fermentación exceden los sistemas buffer, produciendo un gran descenso del pH ruminal. Esta situación puede derivar en la disminución de la función ruminal e incluso del desempeño del animal, según la gravedad del caso (Russell y Hespell, 1981). La acidificación del medio ruminal puede ser la limitante para la digestión de las paredes celulares de los forrajes. Estudios *in situ* (Tripathi y col., 2004) e *in vitro* (Mouriño y col., 2001), demostraron que la actividad celulolítica y por tanto la digestibilidad de la fibra se reduce frente a un pH ruminal bajo, así como también las reacciones de desaminación necesarias para la actividad de la flora celulolítica (Annison y col., 2002), aunque esto depende del tiempo total que el pH se encuentra por debajo de los valores óptimos (Cerrato y col., 2005).

- Nitrógeno Amoniacal ($N\text{-}NH_3$)

El $N\text{-}NH_3$ ruminal surge como producto final de la degradación de proteínas, a partir del catabolismo microbiano ruminal de aminoácidos, péptidos y sustancias nitrogenadas no proteicas como la urea, obtenida a partir de la dieta o endógena (Russell y Hespell, 1981). La mayoría de las bacterias ruminales pueden utilizar $N\text{-}NH_3$ como fuente de N para su crecimiento (Russell y Wilson, 1996). 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 concentración de $N\text{-}NH_3$ es esencial para el crecimiento microbiano, principalmente para las bacterias celulolíticas (Van Soest, 1994).

Cerca del 50 al 70% del N total ingerido normalmente es liberado como NH_3 en el rumen. Una parte de este NH_3 es incorporado en los compuestos nitrogenados microbianos, mientras que el restante, generalmente la mayor parte, se absorbe a través del epitelio ruminal y es transportado vía portal al hígado. La absorción de NH_3 es directamente proporcional a su concentración en el rumen y aumenta con el aumento del pH del fluido ruminal (Kozloski y col., 2009). El hígado tiene la capacidad de transformar el $N\text{-}NH_3$ en urea (proceso denominado ureogénesis) con un costo energético de baja importancia (Di Marco y col., 1998). Gran parte de la urea así producida vuelve al rumen (a través de la saliva o por difusión a través de la pared ruminal), por lo que dicho proceso resulta muy útil para el animal debido a que las bacterias ruminales son capaces de utilizar el N de la urea para sintetizar proteínas, que luego serán absorbidas en el intestino delgado (Tebot y col., 2002). De esta manera, la síntesis de urea en el hígado a partir del NH_3 absorbido, y su reciclaje en el rumen podrían resultar en una ventaja productiva en situaciones de carencia de N.

La concentración de $N\text{-}NH_3$ en el rumen puede variar considerablemente dependiendo del tiempo y la frecuencia de alimentación de los animales, además de otros factores como, la tasa de liberación y disponibilidad de CH, y su balance con la disponibilidad de N, los cuales pueden causar variaciones en la eficiencia de utilización del $N\text{-}NH_3$ por parte de los mo (Hristov y col., 2005). De esta manera, si es limitada la cantidad de energía presente en el rumen, obtenida a partir de la fermentación de la MO, la degradación de las proteínas de la dieta a $N\text{-}NH_3$ y su captación para síntesis de proteína microbiana (PM) por parte de los mo serán también limitadas (Hristov y col., 1997).

Las concentraciones amoniacales necesarias para una máxima SPM se conseguirían con el consumo de forrajes con niveles proteicos de alrededor de 12 a 14%. Algunos trabajos concluyen que la eficiencia de uso del N para la SPM, mejora cuando el $N\text{-}NH_3$ en rumen actúa como limitante (Fernández, 1998). Cuando los rumiantes consumen pasturas de buena calidad, las concentraciones de $N\text{-}NH_3$ ruminal varían entre niveles de 6 a 30 mg/dL (Nápoli y Santini, 1988; Khalili y Sairanen, 2000), siendo generalmente superiores a las consideradas como necesarias para un uso eficiente de los CH para el crecimiento microbiano (Pereira y col., 2007). En este sentido, en situaciones de pastoreo de alfalfa de buena calidad las concentraciones de $N\text{-}NH_3$ pueden llegar a niveles promedios diarios de 42 mg/dL en el líquido ruminal, con picos superiores a 60 mg/dL (Fernández, 1998). Trabajos realizados en nuestro país, con rumiantes pastoreando praderas

implantadas de gramíneas y leguminosas dan como resultado concentraciones ruminales de N-NH_3 elevadas, con promedios de 20,1 mg/dL, por lo que no serían limitantes para el crecimiento microbiano (Repetto y col., 2001). En general, la concentración de N-NH_3 aumenta durante la comida y alcanza un nivel máximo al final de la misma (Rémond y col., 1993).

PRODUCCIÓN DE PROTEÍNA MICROBIANA

Los rumiantes son capaces de convertir la proteína vegetal ingerida en proteína animal (Galdamez-Cabrera y col., 2003), y para esto necesitan del aporte de aminoácidos que se obtienen en un porcentaje a partir de proteínas de la dieta que escapan a la fermentación ruminal (proteínas by pass) y mayoritariamente de las proteínas sintetizadas en el rumen en forma de PM (Astibia y col., 1984). Estas proteínas son propias del soma de los mo que conforman la flora ruminal normal (Relling y Mattioli, 2003). Los mo ruminales son capaces de sintetizar de novo los diez aminoácidos esenciales para los tejidos de los mamíferos (Nolan y Dobos, 2005). La síntesis de aminoácidos, como se mencionó anteriormente, se realiza a partir de N-NH_3 y esqueletos carbonados simples producidos durante la degradación del alimento. Estas bacterias ruminales poseen entre 30 y 50% de proteína verdadera, la cual tiene un 70 a 75 % de digestibilidad y un valor biológico de más del 70%. Por lo tanto, la PM, debe ser considerada como la principal fuente de proteína para el rumiante, ya que, como se mencionó anteriormente, la flora microbiana que pasa junto al bolo alimenticio a las partes posteriores del tracto digestivo puede representar hasta el 60 % del total de aminoácidos que ingresan al duodeno (Clark y col., 1992).

Para la SPM, los mo ruminales requieren de una sincronía entre los aportes de N y de energía (Akif Karsli y Russel, 1999) En caso de no haberla, por ejemplo, ante un escaso aporte energético de la dieta, la utilización de N por los mo y la producción de PM decaen (Hristov y col., 1997). La eficiencia de síntesis de PM (ESPM) se puede definir como los gramos de N microbiano (Nmo) que pasan por el duodeno por unidad de energía disponible en rumen, expresada como MO verdadera o CH fermentados en rumen (Clark y col., 1992). Según Bach y col. (2005) el óptimo crecimiento microbiano en rumen ocurre cuando la ESPM es 29 g de Nmo/kg de MO fermentada en rumen. Sin embargo, esta forma de expresar la ESPM es incapaz de estimar la eficiencia con la cual la bacteria captura el N disponible en rumen, la cual se puede expresar como EUN (en g Nmo/g Ni), siendo el valor óptimo de 69% (Bach y col., 2005). Es así como un correcto equilibrio entre la disponibilidad de N y la liberación de energía en el rumen obtenidos por ejemplo de una pastura de buena calidad, aumenta la ESPM y por lo tanto la tasa de crecimiento de los animales (Lee y col., 2002).

Para la estimación del aporte de Nmo se utilizan diversas técnicas basadas en el uso de marcadores internos (ácido diaminopimélico, ácidos nucleicos, purinas y pirimidinas) y externos (Sandoval y Herrera, 1999). En los rumiantes la hipoxantina, xantina, ácido úrico y alantoína, son el producto final del catabolismo de las purinas, a los cuales se les denomina derivados púricos. Estos parecen provenir principalmente de ácidos nucleicos de los mo que fluyen y son digeridos y absorbidos a nivel duodenal en los rumiantes. Por lo tanto, la determinación de los

derivados púricos excretados en orina representa una alternativa simple y no invasiva para la estimación de la SPM (Sandoval y Herrera, 1999).

RESTRICCIÓN DEL TIEMPO DE ACCESO A LA PASTURA

Las pasturas templadas son una excelente fuente de nutrientes de bajo costo utilizada para la alimentación de rumiantes, con contenidos de MO y fracciones nitrogenadas altamente degradables en rumen (Bargo y col., 2003; Repetto y col., 2005). Sin embargo, la concentración energética de este tipo de alimentos sumado a sus altos contenidos de humedad y fibra puede resultar en bajos consumos de MS y energía (NRC, 2001). Esto, junto a las fluctuaciones en la disponibilidad de forraje que se dan en las diferentes épocas del año, ha llevado al desarrollo de sistemas de alimentación que combinan diferentes pasturas y restricción del acceso a las mismas, para su mejor aprovechamiento. A modo de ejemplo se podrían mencionar los tambos en los que la alimentación con pasturas se realiza de forma restringida de manera habitual.

Los sistemas de producción de rumiantes de base pastoril están expuestos a una gran variación estacional en producción de forraje tanto en cantidad como en calidad. Esto se explica principalmente por la condición climática de nuestro país (muy variable) donde el crecimiento de las pasturas en el invierno es afectado por una menor radiación solar, y en el verano por una elevada evapo-transpiración. En estos momentos, la restricción en el tiempo de acceso a la pastura puede ser una medida de manejo que permita un uso más eficiente del escaso recurso disponible evitando el pisoteo y sobrepastoreo. La restricción en el tiempo de acceso a la pastura también resulta una medida de alto impacto en épocas donde hay presencia de mucha humedad en la pastura y donde el suelo no permite el pastoreo continuo por los animales (Delagarde y col., 2008; Chilibroste y col., 2007).

Al restringir el tiempo de acceso al alimento se alarga el período durante el cual el animal se encuentra en ayuno. En general, frente al ayuno, los animales modifican su comportamiento aumentando el tiempo total que efectivamente dedican al pastoreo a través de una disminución en la cantidad de sesiones de pastoreo y un aumento en la duración de las mismas. Chilibroste y col. (1997) reportaron aumentos significativos en el largo de la primera sesión de pastoreo de vacas expuestas a 16,5 h de ayuno comparado con vacas con sólo 2,5 h de ayuno. En algunos casos (Gregorini, 2012), se observa además una disminución del tiempo diario de rumia en los animales restringidos debido fundamentalmente a una reducción de la misma durante la primer sesión de pastoreo (Gregorini y col., 2009). Otro mecanismo adaptativo que se observa en los animales frente a la restricción, es un aumento en la tasa de consumo, como forma de intentar mantener el consumo total de MS.

Sin embargo, la efectividad de estos mecanismos en compensar el consumo de vacas lecheras con acceso restringido a la pastura es variable, y depende mayormente de la severidad de la restricción, y de factores vinculados a la dieta (ej. proporción de pastura en la dieta, disponibilidad de MS de pastura/ha), o al animal (ej. potencial productivo, etapa de lactancia). Por ejemplo, Chilibroste y col. (2007) no reportaron efectos de la restricción en el tiempo de acceso a la pastura sobre el

consumo de vacas lecheras y/o la producción de leche, al restringir el tiempo de acceso al pastoreo de 16 a 8 h/día, o de 6 a 8 h/día. En otros casos la reducción del tiempo de acceso al pastoreo de 8-9 a 4 h, determinó una reducción del consumo de pastura y de la producción de leche a pesar de un aumento de la tasa de consumo (Kristensen y col., 2007; Pérez-Ramírez y col., 2008). Estos autores también reportaron un aumento en la proporción del tiempo efectivo de pastoreo como otro mecanismo compensatorio frente a la restricción.

En bovinos de carne son más escasos los trabajos sobre restricción, y los resultados tampoco son concluyentes. Ginane y Petit (2005) encontraron una reducción del consumo de pastura cuando se restringió el pastoreo de 24 a 5 h diarias, mientras que Gregorini y col. (2008) no reportaron diferencias en consumo de forraje o ganancia de peso en vaquillonas sometidas a una restricción de 11 a 4 h diarias de acceso a la pastura, debido a un aumento en la tasa de consumo y en el tiempo efectivo de pastoreo frente a la restricción.

- Efecto sobre el ambiente ruminal (pH y N-NH_3)

Los cambios en el patrón de ingestión de pastura, como los que ocurren frente a una restricción en el tiempo de acceso al alimento, pueden verse reflejados en cambios en el ambiente ruminal. Chilibroste y col. (2007) han reportado que una alta tasa de consumo (como la que desarrollan los animales al acceder al alimento luego de un ayuno) en vacas lecheras alimentadas con pasturas de alta calidad puede ocasionar una elevada tasa de fermentación de los CH no estructurales de las mismas. Esto generalmente conduce a una elevada producción de AGV que se ve reflejada en una disminución del pH ruminal. Esta situación de bajos pH puede persistir por algunas horas y posteriormente el pH vuelve a aumentar, debido a la remoción de los AGV, y/o al aporte de sustancias buffer procedentes principalmente de la saliva producida durante la rumia (Palmonari y col., 2010).

En nuestro país, Pérez-Ruchel (2006), trabajando con ovinos alimentados exclusivamente con una pastura mezcla de gramíneas (90%) y leguminosas (10 %) suministrada durante 4 h al día, registró un descenso del pH ruminal posterior al inicio de la alimentación que persistió durante varias horas del día. Cajarville y col. (2006c) en una revisión de experimentos nacionales donde trabajaron con diferentes categorías de animales alimentadas mayormente con forraje fresco (60 % o más de la dieta) encontraron que el pH ruminal en general varió según la frecuencia de alimentación a la que fueron sometidos los animales. Animales en un régimen de baja frecuencia diaria de alimentación (y por ende menor tiempo total de acceso al forraje), presentaron niveles de pH ruminal inferiores a 6,2 durante gran parte del día, a diferencia de los observados en animales alimentados con una alta frecuencia de alimentación que fueron más altos (Cajarville y col., 2006c). Por lo tanto, el manejo del pastoreo con herramientas como la restricción del acceso al mismo por horas, puede modificar el patrón normal del pH ruminal, aunque este no depende sólo de la frecuencia del pastoreo, sino también de la intensidad y de la duración del mismo (Gregorini y col., 2008). A su vez, el pH puede modificar la proporción de N-NH_3 en el rumen, produciéndose un aumento en la concentración del mismo cuando el pH disminuye desde un valor de 7 a 5,8 (Shriver y col., 1986).

A nivel nacional, Chilibroste y col. (2007) reportaron caídas en el pH luego del inicio de la ingesta (7,05 a 6,15) y valores mínimos de pH (6,20) similares al evaluar dos tiempos de acceso (16 *vs* 8 h/día) a una pastura mezcla de gramíneas y leguminosas (*Trifolium repens* (50%), *Lotus corniculatus* (30%) y *Festuca arundinacea* (20%)) en vacas lecheras en las cuales no encontraron diferencias ni en el consumo ni en la producción de leche (13,6 kg/día). Sin embargo, dichos autores al trabajar con vacas lecheras de mayor producción (22,0 kg/día) frente a la misma restricción observaron diferentes dinámicas de pH a nivel ruminal como consecuencia de los diferentes patrones de ingestión desarrollados por los animales frente a la restricción. Dichos autores reportaron una caída continua del pH desde el inicio al fin de la ingesta en los animales con 8 h de acceso al pastoreo, pero a partir del fin del mismo el pH aumentó continuamente hasta el siguiente pastoreo. Sin embargo, en las vacas con mayor acceso al pastoreo (16 h/día dividido en dos sesiones de 8 h cada una) el pH alcanzó su mínimo valor a las 5 h de iniciado el mismo, lo cual puede ser debido a que las vacas pararon su consumo activo de pasto antes que las vacas más restringidas. Las vacas restringidas alcanzaron similares valores de consumo que las del control a pesar de tener 8 h menos de acceso a la pastura, gracias a un incremento en su tasa de consumo a expensas del tiempo de rumia, sin embargo, su producción de leche fue menor (23,4 *vs* 20,6 para 16 y 8 h/día, respectivamente).

Chilibroste y col. (2007) trabajando con vacas lecheras a las cuales se las hacía ayunar por 16 h para luego permitirles un pastoreo diferencial por horas (1, 1,75, 2,5 ó 3,25 h de acceso al pastoreo) observaron una disminución lineal en el pH y un aumento lineal en el tamaño del pool de NH_3 a medida que aumentaba el acceso al pastoreo (de 1 a 3,25 h).). En otro trabajo a nivel nacional, Pérez-Ruchel y col. (2009 y 2012) al evaluar dos tiempos de acceso a una pastura de *Lotus corniculatus* en ovinos (24 *vs* 6 h/día), reportaron una mayor tasa de consumo en los animales restringidos, aunque los mismos no lograron alcanzar el consumo total de los animales sin restricción. Sin embargo, a pesar de estas diferencias observadas en el patrón de consumo, no se encontraron diferencias ni en el pH ni en la concentración de N-NH_3 ruminal.

Por otra parte, Doreau y col. (2004) trabajando con vacas alimentadas por debajo de los requerimientos de mantenimiento (consumo de alimento equivalente al 80 *vs* 27 % de los requerimientos de energía de mantenimiento), encontraron que las vacas con menor consumo presentaron menores concentraciones de N-NH_3 y mayores valores medios de pH a nivel ruminal, probablemente debido a la menor cantidad de materias nitrogenadas y MO fermentable en rumen.

- Efecto sobre la síntesis de proteína microbiana

Los principales factores que influyen en la producción microbiana ruminal son: el nivel proteico de la dieta, la cantidad y disponibilidad de N, el nivel de ingesta, y, fundamentalmente, la cantidad, disponibilidad, tipo y balance de CH (Dewhurst y col., 2000). Una correcta sincronización entre el aporte de materias nitrogenadas y CH solubles al rumen favorecería el crecimiento microbiano, e incrementaría el flujo de PM al duodeno (Berzaghi y col., 1996). Según Kozloski y col. (2009), una alta frecuencia de alimentación aumentaría la disponibilidad de N y energía en el rumen

en diferentes momentos del día, con lo cual podría aumentar la SPM a nivel ruminal como se vio anteriormente.

Dehority y Tirabasso (2001), al evaluar las concentraciones de bacterias y hongos a nivel ruminal en ovinos alimentadas 1, 6 ó 24 veces por día con una misma cantidad total de una dieta peleteada con un alto contenido de fibra, concluyeron que las concentraciones de mo a nivel ruminal no serían influenciadas fuertemente por la frecuencia diaria de alimentación si la cantidad total de la dieta suministrada es la misma. Doreau y col. (2004) trabajando con vacas alimentadas por debajo de los requerimientos de mantenimiento, reportaron una menor síntesis de Nmo (estimado por los derivados de purina eliminados en orina) en las vacas con menor consumo. Sin embargo, la ESPM expresada como g de Nmo/kg de MO digestible no fue afectada por el nivel de consumo.

Por otra parte, Gregorini y col. (2008) al evaluar en vaquillonas de raza carnicera alimentadas con una pastura de *Triticum aestibum*, asignaciones a un nuevo pastoreo de mañana o de tarde, y dos tiempos de acceso al mismo; 4 u 11h/día, no encontraron diferencias en el flujo de Nmo hacia el duodeno entre los diferentes tiempos de acceso al alimento con la asignación del nuevo pastoreo por la mañana. Sin embargo, al comparar los diferentes tiempos de acceso al pastoreo con la asignación del mismo por la tarde, las vaquillonas más restringidas tuvieron un menor flujo de Nmo a duodeno. Según los autores, estas diferencias probablemente se deban a diferencias en el patrón de consumo. A nivel nacional, Pérez-Ruchel (2010) al evaluar dos tiempos de acceso a una pastura de *Lotus corniculatus* en ovinos, reportó un mayor flujo de Nmo a duodeno en los animales alimentados durante todo el día respecto a los animales alimentados durante 6 h/día. Sin embargo, la ESPM expresada como g de Nmo/kg de MO digestible ingerida no difirió entre tratamientos.

HIPÓTESIS

La restricción en el tiempo de acceso a un forraje fresco de alta calidad en terneras de carne determinará cambios en el ambiente ruminal y en la SPM.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto del tiempo de acceso a un forraje fresco de alta calidad sobre el comportamiento del ambiente ruminal en terneras de carne.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar la forma en que el tiempo de acceso a un forraje fresco de alta calidad afecta el ambiente ruminal en terneras de carne.

- Evaluar cómo el tiempo de acceso a un forraje fresco influye en la SPM y en su eficiencia en terneras de carne.

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo de campo se realizó en el Campo Experimental N°2 de Facultad de Veterinaria, en la Unidad de Digestión y Metabolismo Ruminal de los Departamentos de Bovinos y Nutrición, ubicada en Libertad, departamento de San José. Todos los análisis se realizaron en el Laboratorio de Nutrición Animal de la Facultad de Veterinaria y en el Laboratorio de Nutrición del Campo Experimental Nº2 de la Facultad de Veterinaria. Los procedimientos con animales, fueron realizados siguiendo los protocolos aprobados por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (C.H.E.A), de la UdelaR, Uruguay.

Animales y diseño experimental

Se utilizaron 24 terneras cruza Hereford x Angus, de 10,1 ± 0,3 meses de edad, y 153,1 ± 18,1 kg de PV. Previo al período de mediciones se le implantó a todos los animales (bajo anestesia local), un catéter a nivel de rumen para la posterior colecta de líquido ruminal, y durante el período correspondiente a la colecta de orina se les colocó una sonda uretral a cada animal. Los animales fueron agrupados por peso vivo en 6 bloques y dentro de cada bloque se distribuyeron en 4 tratamientos, de acuerdo a un diseño de bloques completos al azar.

El período experimental fue de 30 días en total, los primeros 14 días correspondieron a un período de adaptación de los animales a la dieta y a las instalaciones, y los 16 días siguientes se realizaron las mediciones.

Tratamientos

Los tratamientos fueron los siguientes:

- T4: pastura fresca suministrada cortada durante 4 horas diarias;
- T6: pastura fresca suministrada cortada durante 6 horas diarias;
- T8: pastura fresca suministrada cortada durante 8 horas diarias;
- T24 o control: pastura fresca suministrada cortada durante 24 horas diarias.

Alimentos y manejo

Durante el experimento los animales se alojaron en jaulas metabólicas donde contaban con libre acceso al agua, y se alimentaron con una pastura mezcla de gramíneas y leguminosas en estado vegetativo que se les ofreció en forma cortada (de aquí en más, forraje fresco). La pastura utilizada estaba compuesta principalmente por Trébol blanco (*Trifolium repens*) y Raigrás anual (*Lolium multiflorim*). La composición química promedio de la pastura ofrecida durante el experimento se presenta en el Cuadro I.

La pastura fue cortada diariamente a 10 cm del suelo con una sesgadora de discos y suministrada el mismo día a los animales sin restricción de cantidad (por reposición continua) durante el tiempo establecido para cada tratamiento, a partir de las 08:00 h (hora 0). El sobrante de cada día se desechaba al día siguiente previo a la hora 0 de alimentación.

Cuadro I. Composición química promedio de la pastura (% en base seca) utilizada durante el período experimental.

MS	MO	FND	FAD	PB
15,3	88,2	48,2	26,2	19,1

Determinaciones y cálculos

Para determinar la composición química del alimento se tomaron muestras periódicamente del forraje ofrecido a los animales, las cuales se secaron en estufa a 55 °C y luego se molieron en un molino con tamaño de malla de 1 mm previo a su análisis. Los contenidos de MS, MO y PB (N x 6,25) se analizaron según AOAC (1990), y los de FDN y FDA según la técnica descrita por Van Soest y col. (1991).

Ambiente ruminal

Se tomaron muestras de líquido ruminal de cada animal a cada hora durante 24 h a través del catéter implantado en rumen. En dichas muestras se midió el pH ruminal inmediatamente después de tomadas, utilizando un pH-metro digital. Para la determinación de la concentración de N-NH_3 se conservó una muestra (10 mL) del líquido ruminal extraído, por hora y por animal, en una solución de NaCl al 20% (10 mL) congelada a -18 ºC. Posteriormente se determinó la concentración de N-NH_3 mediante destilación directa de la muestra en micro-Kjeldahl (FAO 1986).

Síntesis de proteína microbiana

La SPM ruminal se estimó indirectamente a través de la cuantificación de derivados púricos eliminados en orina según la técnica propuesta por Chen y Gomes (1995). Para esto se colectó durante 5 días consecutivos la totalidad de la orina emitida por los animales mediante sondaje uretral sobre una solución conservante (H_2SO_4 al 10%) y se almacenó congelada a -18 ºC una alícuota diaria. Para la constitución del pool de orina por animal, se utilizó una alícuota diaria proporcional al volumen total de orina emitido. Las concentraciones de alantoína y ácido úrico se determinaron sobre dicho pool según Balcells y col. (1992) por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC, Dionex Ultimate 3000) utilizando una columna Acclaim, C18, 5µM, 4,6 x 250 mm a 205 nm y alopurinol como estándar interno.

Los derivados púricos totales se calcularon como la suma de ácido úrico y alantoína. La cantidad de purinas microbianas absorbidas (X, mmol/día) y la cantidad de derivados de purinas excretadas (Y, mmol/día, considerando 158 mg/mmol de alantoína y 168 mg/mol de ácido úrico) se calculó en base a la ecuación descrita por Chen y Gomes (1995):

$$\mathbf{X= (Y- 0,385 \times PV^{0,75}) / 0,85}$$

El flujo de Nmo a duodeno fue estimado como:

$$\mathbf{Nmo\ (g/d) = X\ (mmol/d) \times 70\ (mgN/mmol)/ 0,116 \times 0,83 \times 1000 = 0,727X}$$

asumiendo un coeficiente de digestibilidad de las purinas microbianas de 0,83, un contenido de N en las purinas de 70 mgN/mmol y una relación N de purinas/N total de 0,116 (Chen y Gomes, 1995).

La ESPM en rumen fue expresada como: g de Nmo por kg de MO digestible ingerida (g Nmo/kg MODI), y la eficiencia de uso del N como: g de Nmo por g de N ingerido (g Nmo/g Ni).

Análisis estadístico

Los datos se sometieron inicialmente a un análisis para detectar valores atípicos y para comprobar la normalidad de los residuales mediante procedimientos univariantes (PROC UNIVARIATE). El efecto de la restricción en el tiempo de acceso a la pastura se analizó utilizando un modelo mixto (PROC. MIXED del SAS). Para los datos de SPM y ESPM el modelo utilizado fue el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + B_j + e_{ij}$$

Donde μ es la media general, T_i es el efecto fijo del tratamiento, B_j el efecto aleatorio del bloque, y e_{ij} es el error residual.

Para las variables con medidas repetidas en el tiempo (pH y concentraciones de N-NH_3) se utilizó el siguiente modelo mixto:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + H_j + (TxH)_{ij} + B_k + e_{ijk}$$

Donde μ es la media general, T_i es el efecto fijo del tratamiento, H_j es el efecto fijo de la hora, $(TxH)_{ij}$ el efecto fijo de la interacción tratamiento x hora, B_k el efecto aleatorio del bloque y e_{ijk} es el error residual.

La estructura de covarianza utilizada fue AR (1) + RE (Littell y col., 1998). Todos los resultados se presentan como medias de cuadrados mínimos ± error estándar de la media (EEM) a menos que se indique lo contrario. Las medias de todos los parámetros se compararon mediante el test de Tukey y se aceptaron como diferencias significativas valores de $P \leq 0,05$ y como tendencias valores de $0,05 < P \leq 0,10$.

RESULTADOS

Ambiente ruminal

En el Cuadro II se pueden observar las medias para los valores de pH ruminal. El pH ruminal fue afectado por el tratamiento ($P < 0,001$), siendo mayor el pH de los grupos más restringidos (T4 y T6) respecto al del grupo control. También se detectó un efecto de la hora de muestreo ($P < 0,001$) y de la interacción tratamiento por hora ($P < 0,001$). En la Figura 1 se presenta la evolución diaria del pH para los diferentes tratamientos. En los grupos restringidos el pH disminuyó después del inicio de la ingesta (hora 0), alcanzando los valores mínimos entre las 5 y 6 h posteriores a la misma. Luego de la hora 13 se observó un ascenso del pH de los grupos restringidos, y alcanzó valores promedio superiores respecto al control entre la hora 20 y el inicio de la próxima ingesta. Mientras tanto para los animales no restringidos el pH tuvo una mayor estabilidad, no variando a lo largo del día.

La concentración media de N-NH_3 ruminal fue afectada por el tratamiento ($P < 0,005$), presentando menores valores promedio los grupos más restringidos (T4 y T6) respecto al grupo control (Cuadro II). También se encontró un efecto de la hora de muestreo ($P < 0,001$) y de la interacción tratamiento por hora ($P < 0,001$). Como se puede observar en la Figura 2, las concentraciones de N-NH_3 de los grupos restringidos fueron mayores respecto al grupo control entre la hora 6 y 8 luego del inicio de la ingesta ($P < 0,001$) (momento en que alcanzaron sus valores máximos), sin diferencias entre grupos restringidos. Posteriormente, las concentraciones de N-NH_3 disminuyeron hasta la hora 14, para luego aproximarse a los valores previos al inicio de la alimentación. Los grupos más restringidos presentaron concentraciones mínimas de N-NH_3 más bajas (entre la hora 14 y 18 luego del inicio de la ingesta) respecto al grupo T24 ($P < 0,001$). A diferencia de los grupos restringidos, la concentración de N-NH_3 ruminal de los animales sin restricción alimenticia mostró una mayor estabilidad a lo largo de las 24 h de medición.

Proteína microbiana

La síntesis de proteína microbiana tendió a ser mayor en los animales sin restricción de acceso al forraje ($P = 0,07$), como se puede observar en el Cuadro III. Sin embargo, no hubo diferencias significativas ni en la ESPM (g Nmo/kg MO digestible ingerida) ni la eficiencia de uso del N (g Nmo/g Ningerido) ($P > 0,10$) como se puede ver en el Cuadro III.

Cuadro II. Valores promedio de pH y de concentración de N-NH_3 (mg/dL) ruminal en terneras con diferente tiempo de acceso al forraje fresco: 4, 6, 8 o 24 h/día (T4, T6, T8 y T24, respectivamente).

	Tratamientos				EEM	P		
	T4	T6	T8	T24		T	H	TxH
pH	6,70^{a}	6,64^{ab}	6,47^{bc}	6,30^{c}	0,07	<0,001	<0,001	<0,001
N-NH_3	26,73^{a}	26,55^{a}	28,80^{ab}	30,73^{b}	1,00	<0,005	<0,001	<0,001

EEM: error estándar de la media; P: probabilidad del efecto del tratamiento (T), del efecto de la hora (H), y del efecto de la interacción tratamiento x hora (TxH). Para cada fila, letras diferentes entre medias son significativamente diferentes (P < 0,05).

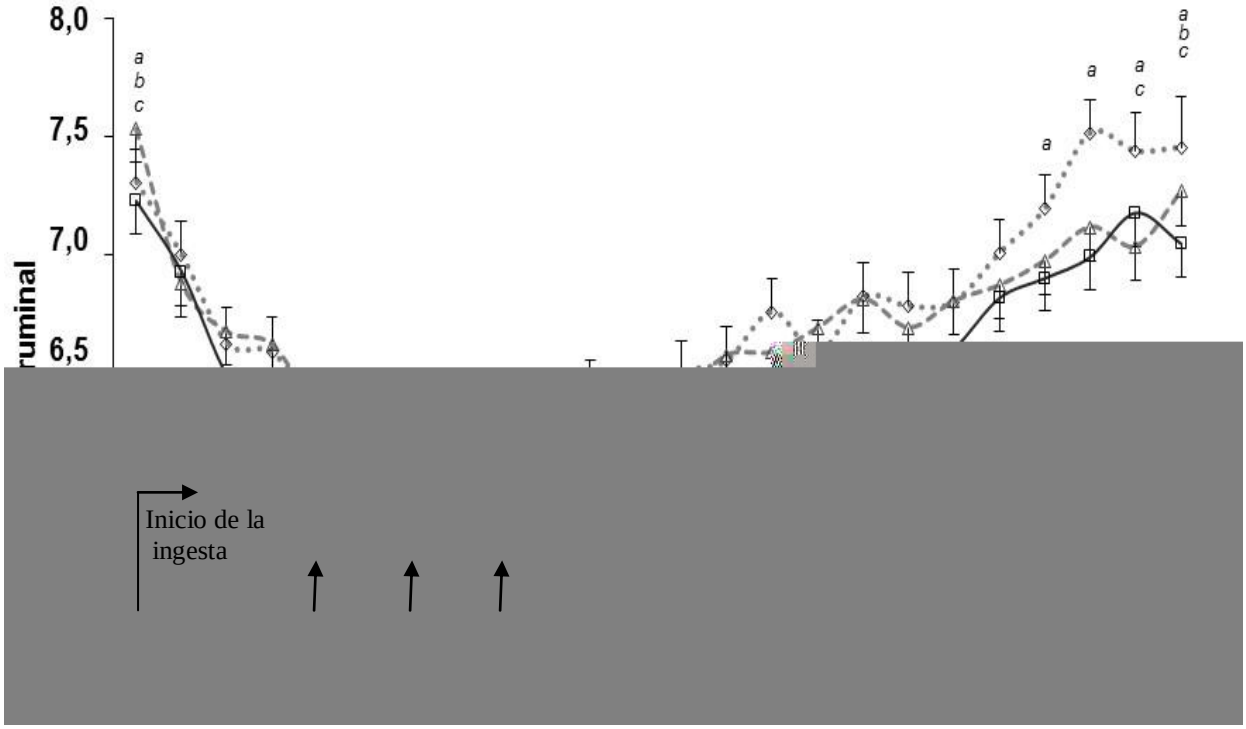

Figura 1. Dinámica del pH ruminal en terneras con diferente tiempo de acceso al forraje fresco: 4, 6, 8 o 24 h/día (T4, T6, T8 y T24, respectivamente), (media ± error estándar de la media). La hora 0 indica el momento de inicio de la ingesta. El eje de las ordenadas comienza en 5,5.
a, T4 significativamente diferente de T24 (*P* < 0,05); b, T6 significativamente diferente de T24 (*P* < 0,05); c, T8 significativamente diferente de T24 (*P* < 0,05).
(··◊·· T4; --Δ-- T6; –□– T8 T24)

DISCUSIÓN

Los valores promedio de pH encontrados en este estudio (6,6 para los grupos restringidos y 6,3 para los animales alimentados sin restricción) están dentro de los rangos reportados previamente en trabajos realizados en nuestro país con rumiantes a pastoreo, en donde los valores varían entre 6,2 y 6,8 (Cajarvile y col., 2000). Según Kolver y de Veth (2002), la fermentación ruminal por parte de la flora celulolítica podría ser mantenida a pesar de largas variaciones en el pH ruminal, siempre y cuando el mismo se mantenga en niveles entre 5,68 y 6,61 por una suficiente proporción del día. En la mayoría de los estudios tanto *in vitro* como *in vivo* se ha observado que lo que más impacta en la digestión de la fibra son los valores de pH bajos (Mouriño y col., 2001; Tripathi y col., 2004). Mould y col (1984), describen el efecto que causa el pH como bifásico, en donde una reducción del mismo hasta valores de 6,0 causa una depresión moderada en la digestión de la fibra mientras que una disminución por debajo de 6,0 causa una inhibición severa de la misma. Por esto, era de esperarse que a pesar de las severas restricciones impuestas en este caso no se viera afectada la digestibilidad de la fibra, tal como reportaron Félix y col. (2012).

El pH se comportó de forma diferente en los animales restringidos respecto a los no restringidos, lo cual puede estar reflejando diferentes patrones de consumo, ya que algunos autores (Taweel y col., 2004) sugieren que los patrones diurnos de pH no sólo dependen de la frecuencia sino también de la intensidad y la disposición temporal de las sesiones de pastoreo. En este sentido, a partir del inicio de la ingesta, se observa en todos los grupos restringidos un descenso del pH hasta llegar a los valores mínimos entre las horas 5 y 6. Esto probablemente se deba al diferente comportamiento ingestivo; aumento de la tasa de consumo y de la proporción del tiempo dedicado a comer durante las primeras 4 horas luego del inicio de la ingesta, desarrollado por los animales restringidos (Félix y col., 2011). Esto se traduce en un mayor ingreso inicial de alimento al rumen y por ende, una mayor cantidad de nutrientes fermentando, con la consiguiente producción de AGV y su efecto en la disminución del pH (Cajarville y Repetto, 2005). Este efecto sobre el pH se acentuaría cuando se utilizan pasturas tiernas de alta digestibilidad como las utilizadas en este experimento, y cuando las mismas son ingeridas con una alta tasa de consumo instantánea que generalmente es acompañada por una disminución de la rumia y por lo tanto del ingreso de sustancias buffer al rumen (Chilibroste y col., 1998). Pérez-Ruchel y col. (2012) también observaron una disminución del pH luego del inicio de la ingesta debido a la alta tasa de consumo desarrollada por los ovinos restringidos a 6 h en el acceso al alimento.

El acenso posterior del pH en los animales restringidos, que alcanzó valores superiores a los animales sin restricción en las últimas horas de ayuno (hora 20 a 0 respecto al inicio de la ingesta) podría explicarse porque al terminar la ingesta y por ende el ingreso de MO al rumen, disminuye la cantidad de sustrato fermentable para la flora microbiana, por lo que disminuiría la producción de AGV. Éstos disminuyen su concentración debido a la absorción constante por la pared ruminal, y a la disminución en su producción. Además, el aumento de pH en las horas de ayuno probablemente también se deba al efecto de la rumia que aumenta la cantidad de saliva que llega al rumen en relación a la MO disponible, dicha saliva contiene

sustancias buffer (bicarbonato y fosfatos) que aumentan el pH (Krause y Oetzel, 2006). Estas variaciones de pH registradas en los animales restringidos, no se observaron en los animales sin restricción, donde el pH fue más estable a lo largo de todo el día. Esto podría ser debido a un consumo de MO de una forma más continua, lo cual no genera tantas fluctuaciones en la fermentación del alimento y producción de AGV, traduciéndose en un pH más estable. Esto coincide con Abarca y col. (1999), quienes observaron que el pH del rumen no disminuyó cuando los animales fueron alimentados durante todo el día obteniendo valores de pH promedio de 6,7. A su vez, los valores promedio de pH fueron menores para los animales sin restricción, lo cual puede deberse al mayor consumo total de MO registrado en estos animales (Félix y col., 2012) respecto a los restringidos y por ende mayor cantidad de material fermentable. Además posiblemente un mayor tiempo de rumia peritiria a los animales sin restricción obtener valores de pH más estables.

Como era de esperarse, las concentraciones de $N\text{-}NH_3$ en todos los animales restringidos aumentaron a partir de la hora 0, probablemente debido a la mayor tasa de consumo inicial registrada en los animales restringidos (Félix y col., 2011), con el consiguiente mayor ingreso inicial de materias nitrogenadas. Como se vio anteriormente, la mayor parte de los compuestos nitrogenados que llegan al rumen son degradados por los mo ruminales liberando NH_3 (Koslozki, 2009). El ingreso más continuo de alimento (y por lo tanto de materias nitrogenadas) en los animales sin restricción, permitirían explicar que la concentración de $N\text{-}NH_3$ se haya mantenido más estable a lo largo del día en dichos animales.

Los valores máximos de $N\text{-}NH_3$ observados entre las horas 6 y 7 para los animales restringidos, coinciden con el momento de valores mínimos de pH, como ya han reportado otros autores (Pérez-Ruchel, 2006). Las proteínas de la dieta ingerida son desaminadas por parte de la flora microbiana, dejando libre la cadena carbonada y un grupo amino al que se le suma un hidrogenión, formando finalmente $N\text{-}NH_3$. A su vez, las cadenas carbonadas son fermentadas para producir AGV el cual se empieza a acumular. La absorción de $N\text{-}NH_3$ es directamente proporcional a su concentración en el rumen y aumenta con el aumento del pH del líquido ruminal (Kozloski, 2009). Por esto, cuando los niveles de fermentación son máximos, disminuye el pH y aumenta la concentración de $N\text{-}NH_3$ (debido a la mayor producción y menor absorción), como se observó en este trabajo.

La disminución posterior de las concentraciones de $N\text{-}NH_3$, particularmente en los grupos más restringidos (T4 y T6), probablemente se deba a la falta de ingreso de materias nitrogenadas al rumen durante el período de ayuno, además del pasaje y la degradación de las materias nitrogenadas ingeridas anteriormente, y a la rápida difusión del $N\text{-}NH_3$ ruminal a través de las paredes del rumen (Kozloski, 2009). Por el contrario, Pérez-Ruchel y col. (2012) no encontró diferencias por restringir el tiempo de acceso a una pastura sobre la dinámica de $N\text{-}NH_3$ en ovinos. Esta diferencia en los resultados puede estar relacionada con el menor nivel de proteína de la pastura usada en dicho estudio (12,8%), que limitaría la cantidad de proteína disponible en rumen para ser degradada a $N\text{-}NH_3$.

Los valores promedios de $N\text{-}NH_3$ en rumen registrados en este trabajo resultaron ser mayores a los descritos por otros autores en bovinos y ovinos consumiendo pasturas como único alimento (Aguerre, 2010; Pérez-Ruchel y col., 2012; Tebot y

col., 2012). En este ensayo las medias se encontraron entre 26,6 y 30,7 mg/dL, mientras que en ovinos Pérez-Ruchel y col. (2012), reportaron niveles de 23,2 mg/dL y Tebot y col. (2012) niveles de 17,4 mg/dL, y en bovinos Aguerre (2010) reportó niveles de 21,8 mg/dL. Esto podría explicarse porque las pasturas utilizadas en dichos trabajos eran de menor calidad proteica (contenido de PB: 12,8; 13,2 y 12,3%; y digestibilidad de la PB: 71,5; 72,5 y 61,5% para Pérez-Ruchel y col., 2012; Tebot y col., 2012, y Aguerre, 2010, respectivamente) respecto al nuestro (contenido de PB 19,1% y digestibilidad de la PB 80,9% este dato fue obtenido en el mismo experimento y publicado por Hernández y col., 2012).

Uno de los principales factores que influyen en la SPM, entre otros es el nivel de ingesta (Dewhurst y col., 2000). Esto puede permitir explicar la tendencia a una mayor SPM registrada en los animales sin restricción, los cuales tuvieron un mayor consumo total. De hecho, la ESPM expresada en función de la MODI no varió entre tratamientos. Esto coincide con lo reportado por Pérez-Ruchel y col. (2012) en ovinos, donde observaron una menor SPM en los ovinos restringidos en el tiempo de acceso al alimento a 6 h/día, y sin embargo no encontraron diferencias en la ESPM expresada en función de la MODI respecto a los ovinos alimentados sin restricción. Por otra parte, Doreau y col. (2004) en vacas lecheras también encontraron que la SPM disminuía cuando el alimento era más restringido. Según Kozloski y col. (2009) una alta frecuencia de alimentación aumentaría la disponibilidad de N y energía en el rumen en diferentes momentos del día, con lo cual podría aumentar la SPM a nivel ruminal.

Astibia y col. (1984) concluyeron que la SPM en ovejas es máxima cuando la concentración de $N\text{-}NH_3$ en el ambiente ruminal se aproxima a valores de entre 5-8 mg/dL. Clark y col. (1992) también sugieren que son necesarios niveles de $N\text{-}NH_3$ superiores a 5 mg/dL para optimizar la SPM. Teniendo en cuenta esto, se puede decir que los valores obtenidos en este trabajo no resultaron limitantes para la SPM en ninguno de los tratamientos, ya que lo menores valores de $N\text{-}NH_3$ que se registraron fueron de 8,45 mg/dL, lo cual se dio en los grupos más restringidos a la hora 14 pos inicio de la ingesta. En este trabajo los animales presentaron valores medios de $N\text{-}NH_3$ entre 26 y 30 mg/dL. Para la SPM, los mo ruminales requieren de una sincronía entre los aportes de N y energía. Los péptidos y los aminoácidos una vez dentro de la célula microbiana, serán transaminados o utilizados directamente para la síntesis de proteína microbiana si la energía está disponible, sin embargo, cuando la energía es limitante, los aminoácidos son desaminados, y su esqueleto carbonado fermenta produciendo AGV (Bach y col., 2005).

Una ineficiente utilización del N dietario por falta de energía en relación al mismo (Nousiainen y col., 2004) puede explicar también los mayores niveles de $N\text{-}NH_3$ a nivel ruminal respecto a otros trabajos. En este sentido, la eficiencia de uso del N (0,37 g Nmo/ g N ingerido, promedio de todos los tratamientos) fue baja respecto a lo reportado en condiciones que permiten un óptimo crecimiento microbiano (0,69 g Nmo/g N ingerido; Bach y col., 2005). Según Herrera-Saldanha y Huber, (1989) esto puede deberse a una falta de balance entre las fuentes proteicas y energéticas de la dieta. Si bien Herrera-Saldanha utilizaron dietas balanceadas, y en nuestro experimento el alimento era solamente forraje, donde hipotéticamente este pudo contener un bajo porcentaje de CH no estructurales, debido a que el trabajo se realizo en invierno y que las pasturas fueron cortadas en la mañana (Griggs y col

2005). A pesar de esto, la ESPM estuvo cercana a los valores reportados en condiciones que permiten un óptimo crecimiento microbiano (29 g Nmo/kg/MOAF, Bach y col., 2005, y en nuestro trabajo 24,0 g Nmo/kg/MOAF promedio de todos los tratamientos).

CONCLUSIONES

La restricción en el tiempo de acceso a un forraje fresco de alta calidad modificó el ambiente ruminal, generando mayores variaciones en las dinámicas tanto del pH como de la concentración del $N\text{-}NH_3$.

La SPM tendió a ser afectada por la restricción debido al menor consumo registrado en dichos animales, sin embargo, la restricción no afectó la ESPM.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **A.O.A.C. (1990).** Association of Official Analytical Chemist. Official Methods of analysis. 15ª. ed. Arlington AOAC, VA. 2 V.
2. **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.
3. **Aguerre M. (2010).** Suplementación con grano de sorgo a vaquillonas consumiendo una pastura templada: efecto sobre el consumo, el aprovechamiento digestivo y el metabolismo de la glucosa. Tesis de Maestría en Nutrición de Rumiantes, Programa de Posgrados de la Facultad de Veterinaria, UdelaR. 45 p.
4. **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.
5. **Annison E.F., Lindsay D.B., Nolan J.V. (2002).** Digestion and metabolism. En: Freer M., Dove H. (Eds.). Sheep Nutrition. Wallingford. CAB International, p.: 95-118.
6. **Araujo F.O., Vergara L.J. (2007).** Propiedades físicas y químicas del rumen. Arch. Latinoam. Prod. Anim. 15(Supl 1): 34-38.
7. **Astibia O.R., Cangiano C.A., Cocimano M.R., Santini F.J. (1984).** Utilización del N por el rumiante. Rev. Arg. Prod. Anim. 4: 373-384.
8. **Bach A., Calsamiglia S., Stern M.D. (2005).** Nitrogen metabolism in the rumen. J. Dairy Sci. 88 (E. Suppl.): E9-E21.
9. **Balcells J., Guada J.A., Peiró J.M., Parker D. (1992).** Simultaneous determination of allantoin and oxypurines in biological fluids by high-performance liquid chromatography. J. Chromatography. 575: 153-157.
10. **Bargo F., Muller L., Kolver, E., Delahoy J.E. (2003).** Invited review: Production and Digestion of supplemented dairy cows on pasture" J. Dairy Sci. 86: 1-42.
11. **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.
12. **Britos A., Mendoza A., Claramunt M., Karlen M., Kelly G., Magallanes L., Ramírez S., Zunini A., Repetto J.L., Cajarville, C. (2009).** Effect of carbohydrate source on rumen fluid pH and in vitro gas production (GP) in heifers fed pasture silage. J. Anim. Sci. 87 (E-Suppl. 2): 152.
13. **Cajarville C., Aguerre M., Britos A., Tebot I., Pérez A., Elizondo V., Repetto J.L. (2006c)**. Effect of feeding frequency of fresh forage on ruminal pH: data review.XIV International Symposium Lameness in Ruminant, Uruguay-Colonia, 7-11 Noviembre, 2006: p. 96.
14. **Cajarville C., Aguerre M., Repetto J. (2006b).** Rumen pH, NH3-N concentration and forage degradation kinetics of cows grazing temperate pastures and supplemented with different sources of grain. Anim. Res. 55: 511–520.
15. **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.
16. **Cajarville C., Mendoza A., Santana A., Repetto J.L. (2012).** En tiempos de intensificación productiva. ¿Cuánto avanzamos en el conocimiento de los nuevos sistemas de alimentación de la vaca lechera? Veterinaria. 48 (Suppl 1): 35-39.
17. **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. 84 / J. Dairy Sci. 89: 103.
18. **Cajarville C., Repetto J.L. (2005).** Uso de concentrados para optimizar el aprovechamiento digestivo de las pasturas. XXXIII Jornadas Uruguayas de Buiatría. Paysandú, Uruguay, pp.121-128
19. **Caramelli A., Antúnez M., Britos A., Zanoniani R., Repetto J.L., Boggiano P., Cajarville C. (2008).** Efecto del horario de corte sobre la producción de gas in vitro de pasturas. XXXVI Jornadas Uruguayas de Buiatría. Paysandú, Uruguay, p: 265-266.
20. **Cazzuli G., Repetto J.L., Pérez A., Britos A., Aguerre M., Garín D., Cajarville C. (2007).** Dinámica de pH y N-NH3 en terneras alimentadas con pastura templada en horarios restringidos. Jornadas Uruguayas de Buiatría. Paysandú, Uruguay, p: 338-339.
21. **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.aidaitea.org/jornada37/3_nutricion/6_RVNII/rvnii7_cerrato_ciclos2005.pdf. Fecha de consulta 26/10/14
22. **Chaudry A.S. (2008).** Forage based animal production systems and sustainability, an invited keynote. Revista Brasileira de Zootecnia. 37 (Supl. E.), p. 78-84.
23. **Chen X.B., Gomes M.J. (1995).** Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle based on urinary excretion of purine derivatives - An overview of the technical details. International Feed Resources Unit Rowett Research Institute, Bucksburn Aberdeen, Scottland, UK. 21p.
24. **Chilibroste P. (2002).** Evaluación de modelos detallados de rumen para predecir disponibilidad de nutrientes en sistemas intensivos de producción de leche bajo pastoreo. Arch. Latinoam. Prod. Anim. 10 (3): 232-240.
25. **Chilibroste P., Soca P., Mattiauda D.A., Bentancur O., Robinson P.H. (2007).** Short term fasting as a tool to design effective grazing strategies for lactating dairy cattle: a review. Aust. J. Exp. Agric. 47: 1075-1084.
26. **Chilibroste P., Tamminga S., Boer H. (1997).** Effect of length of grazing session, rumen fill and starvation time before grazing on dry matter intake, ingestive behavior and dry matter rumen pool sizes of grazing lactating dairy cows. Grass For. Sci. 52: 249-257.
27. **Chilibroste, P. (1998).** Fuentes comunes de error en la alimentación del ganado lechero en pastoreo: I. Predicción del consumo. Facultad de Agronomía, EEMAC, Paysandú, p: 1-8.
28. **Church D.C. (1993).** El rumiante: fisiología digestiva y nutrición. Zaragoza, Ed. Acribia, 641p.
29. **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.

30. **Dehority B.A., Tirabasso P.A. (2001)**. Effect of feeding frequency on bacterial and fungal concentrations, pH, and other parameters in the rumen. J. Anim .Sci. 79: 2908-2912.
31. **Delagarde R., Pérez-Ramírez E., Delaby L., Peyraud J.L. (2008).** Adaptation comportementale et ingestion des vaches laitières soumises à une restriction du temps d'accès journalier au pâturage. Renc Rech Ruminants 15: 323-326.
des aliments dans le reticulo-rumen: cinetique et importance. En: Jarrige R,
32. **Dewhurst R.J., Davies D.R., Merry R.J. (2000).** Microbial protein supply from the rumen. Anim. Feed Sci. Tech. 85: 1-21.
33. **Di Marco O.N., Castiñeiras P., Aello M.S. (1998).** Ruminal ammonia concentration and energy expenditure estimated by the carbon dioxide entry rate technique. Anim. Sci. 67: 435-443.
domestiques. París. INRA. p.: 383-406.
34. **Doreau M., Michalet-Doreau B., Béchet G. (2004).** Effect of underfeeding on digestion in cows. Interaction with rumen degradable N supply. Livest. Prod. Sci. 88: 33-41.
35. **FAO (1986)**: Analytical methods for characterizing feed resources for ruminants. En: Preston, T.R. (ed), Better utilization of Crop Residues and By-Products in Animal Feeding: Research Guidelines 2. A Practical Manual for Research Workers. Roma, Italia. obtenido desde http://www.fao.org/documents/en/detail/27299. Fecha de consulta: 17/12/14.
36. **Félix A., Hernández N., Restuccia P., Ruiz S., Aguerre M., Pérez-Ruchel A., Repetto J.L., Cajarville C. (2012).** Effect of time of access to temperate forage on intake and digestibility of organic matter and fiber fractions in heifers. J. Anim. Sci. Vol. 90, Suppl. 3/J. Dairy Sci. Vol. 95, Suppl. 2, p: 377 (Abstract).
37. **Félix A., Hernández N., Torterolo N., Roja S., Aguerre M., Pérez-Ruchel A., Repetto J.L., and Cajarville C. (2011).** The time of access to temperate pasture influences intake and feeding behavior in heifers. J. Anim. Sci. Vol. 89, E-Suppl. 1/J. Dairy Sci. Vol. 94, E-Suppl. 1 p: 380 (Abstract)
38. **Fernández A. (1998).** Fisiología de la producción de carne, EEA INTA Bordenave, Material Didáctico Nº 3: p 6-34. www.produccion-animal.com.ar. Fecha de consulta 16/1014.
39. **Forbes J.M., Mayes R.W. (2002).** Food choice. En: Freer M, Dove H. (Eds), Sheep nutrition. Wallingford. CAB International. p: 51-69.
40. **Galdámez-Cabrera N.W., Coffey K.P., Coblentz 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.
41. **Ginane C, Petit M. (2005).** Constraining the time available to graze reinforces heifers preference for sward of high quality despite low availability. Appl. Anim. Behav. Sci. 94: 1-14.
42. **Gregorini P. (2012)** Diurnal grazing pattern: its physiological basis and strategic management. Anim. Prod. Sci. 52: 416-430.
43. **Gregorini P., Clark C.E.F., Jago J.G., Glassey C.B., McLeod K.L.M., Romera J. (2009).** Restricting time at pasture: Effects on dairy cow herbage intake, foraging behavior, hunger-related hormones, and metabolite concentration during the first grazing session. J. Dairy Sci. 92: 4572-4579.

44. **Gregorini P., Gunter S.A., Beck P.A. (2008)**. Matching plant and animal processes to alter nutrient supply in strip-grazed cattle: Timing of herbage and fasting allocation. J. Anim. Sci. 86: 1006-1020.
45. **Griggs T.C., MacAdam J.W., Mayland H.F., Burns J. (2005)**. Nonstructural carbohydrate and digestibility patterns in Orchardgrass swards during daily defoliation sequences initiated in evening and morning. Crop. Sci. 45: 1295-1304.
46. **Hernández N., Félix A., Pérez-Ruchel A., Aguerre M., Cajarville C., Repetto J.L. (2012).** Effect of time of access to temperate pasture on nitrogen utilization, digestibility of nitrogen and microbial protein synthesis in heifers. J. Anim. Sci. 90 (Suppl. 3)/J. Dairy Sci. 95 (Suppl. 2), p: 378 (Abstract).
47. **Herrera-Saldanha R., Huber J.T. (1989).** Influence of varying protein and starch degradabilities on performance of lactating cows. J. Dairy Sci. 72: 1477-1483.
48. **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.
49. **Hristov A.N., Ropp J.K., Grandeen K.L., Albedi S., Etter R.P., Melgar A., Foley A.E. (2005).** Effect of carbohydrate source on ammonia utilization in lacting dairy cows. J. Anim. Sci. 83: 408-421.
50. **INIA (2009)** Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias. (2009). Dispoible en: http://www.inia.org.uy/online/site/339958I1.php#seccion2575) Fecha de consulta: 26/9/14.
51. **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.
52. **Kolver E.S., de Veth M.J. (2002).** Prediction of ruminal pH from pasture-based diets. J. Dairy Sci. 85: 1255-1266.
53. **Kozloski G.V., Cadorin Jr R.L., Härter C.J., Oliveira L., Alves T.P., Mesquita F.R., Castagnino D.S. (2009).** Effect of suplemental 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.
54. **Krause K.M., Oetzel G.R. (2006).** Understanding and preventing subacute ruminal acidosis in dairyherds: A review. Anim. Feed Sci. Tech. 126: 215-236.
55. **Kristensen T., Oudshoorn F., Munksgaard L., Søegaard K. (2007).** Effect of time at pasture combined with restricted indoor feeding on production and behavior in dairy cows. Cambridge journals, Animal vol. 1. pp 439-448. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1017/S1751731107694117. Fecha de consulta: 29/9/14
56. **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.
57. **Littell R.C., Henry P.R., and Ammerman C.B. (1998).** Statistical analysis of 630 repeated measures data using SAS procedures. J. Anim. Sci. 76: 1216-1231.

58. **Lovett G.M., Canham C.D., Arthur M.A., Weathers K.C., Fitzhugh R.D. (2006).** Forest ecosystem responses to exotic pests and pathogens in eastern North America. BioSci. 56: 395–405.
59. **Mayland H., Mertens D., Taylor B., Burns J., Fisher D., Gregorini P., Ciavarella T., Smith K., Shewmaker G., Griggs T. (2005).** Diurnal changes in forage quality and their effects on animal preference, intake, and performance. In: Proceedings of the 35th California Alfalfa & Forage Symposium, December 12–14, 2005, Visalia, CA, USA, pp.: 223–230.
60. **Mould F.L., Orskov E.R., Mann S.O. (1984).** Associative effects of mixed feeds. Effects of type and level of supplementation and the influence of the tureen fluid pH on cellulolysis in vivo and dry matter digestion of various roughages. Anim. Feed Sci. Tech. 10: 1-14.
61. **Mouriño E.J., Akkarawongsa R.A., Weimer P.J. (2001).** Initial pH as a determinant of cellulose digestion rate by mixed ruminal microorganisms in vitro. J. Dairy Sci. 84: 848-859.
62. **Napoli G.M., Santini F.J. (1988**). Suplementación energético-proteica de forrajes frescos en condiciones de pastoreo: I. Efectos sobre el medio ambiuente ruminal y la degradabilidad proteica. Rev. Arg. Prod. Anim.8 (sup 1): 39.
63. **Nolan J.V., Dobos R.C. (2005).** Nitrogen transanctions in ruminants. In. Dijkstra j., Forbes J.M., France J., (eds), Quantitative aspects of ruminal digestion and metabolism 2a ed. Wallingford: CABI. p.: 177-206.
64. **Nousiainen J., Shingfield K.J., Huhtanen P. (2004).** Evaluation of Milk Urea Nitrogen as a Diagnostic of Protein Feeding. J. Dairy Sci. 87: 386-398.
65. **NRC (2001).** Nutrient Requirements of Dairy Cattle. 7a. Ed. National Academy Press. Washington D.C. 381p.
66. **Owens F.N., Goetsch A.L. (1988).** Fermentación ruminal. En: Church C.D. (Ed.). El rumiante, fisiología digestiva y nutrición. Zaragoza. Acribia. p.: 159-189.
67. **Owens F.N., Secrist D.S., Hill W.J., Gill D.R. (1998).** Acidosis in cattle: a review. J. Anim. Sci. 76: 275–286.
68. **Palmonari A., Stevenson D.M., Mertens D.R., Cruywagen C.W., Weimer P.J. (2010).** pH dynamics and bacterial community composition in the rumen of lactating dairy cows. J. Dairy Sci. 93: 279-287.
69. **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. Livest. Sci. 107: 53-61.
70. **Pérez-Ramírez E., Delagarde R., Delaby L. (2008).** Herbage intake and behavioural adaptation of grazing dairy cows by restricting time at pasture under two feeding regimes. J. Dairy Sci. 91: 1384-1392.
71. **Pérez-Ruchel 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.
72. **Peréz-Ruchel 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, Facultad de Veterinaria. UdelaR. 53 p.

73. **Pérez-Ruchel A., Repetto J.L., Cajaraville C. (2012).** Suitability of live yeast addition to alleviate the adverse effects due to the restriction of the time of access to feed in sheep fed only pasture. J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. doi:10.1111/jpn.12008.
74. **Pérez-Ruchel A., Repetto J.L., Sanguinetti F., Cajaraville C. (2009).** Comportamiento ingestivo y digestibilidad en rumiantes según el tiempo de acceso al forraje. Rev. Arg. Prod. Anim. Vol. 29, Supl. 1: 287
75. **Phillipson A.T. (1981).** Digestión en el rumiante. En: Fisiología de los animales domésticos. Dukes H.H., Swenson M.J. (Eds.). México. Aguilar.
76. **Rearte D.H., Santini F.J. (1989).** Digestión ruminal y producción en animales a pastoreo. Rev. Arg. Prod. Anim. 9:93-105.
77. **Relling A.E., Mattioli G.A. (2003).** Fisiología Digestiva y Metabólica de los Rumiantes. Ed EDULP, La Plata, Argentina. 71 p.
78. **Rémond, D., Chaise, J.P., Delval, E., Poncet, C. (1993).** Net Flux of Metabolites Across the Ruminal Wall of Sheep Feed Twice a Day With Orcardgrass Hay. J. Anim. Sci. 71: 2529-2538.
79. **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.
80. **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.
81. **Repetto J.L., Cajarville C. (2009).** ¿Es posible lograr la sincronización de nutrientes en sistemas pastoriles intensivos? XXXVII Jornadas Uruguayas de Buiatría. Paysandú, Uruguay, p: 60-67.
82. **Rovira J. (1996).** Manejo nutritivo de los rodeos de cría en pastoreo. Montevideo. Ed. Hemisferio Sur. 288 p
Ruckesbush Y, Demarquilly C, Farce MH, Journet M. Nutrition des rumiants
83. **Russell J.B., Hespell R.B. (1981).** Microbial rumen fermentation. J. Dairy Sci. 64: 1153-1169.
84. **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.
85. **Sandoval C.A., Herrera F. (1999**). Estimación de la síntesis de proteína microbial en rumiantes a través de la medición de los derivados de purina en orina. Rev. Biomed. 10: 241-251.
86. **Satter L.D., Slyter L.L. (1974).** Effect of ammonia concentration on rumen microbial protein production in vitro. Br. J. Nutr. 32: 199-208.
87. **Sauvant D., Grenet E., Michaelt- Doreau B. (1995).** Degradation chimique
88. **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.
89. **Sniffen C.J., Thomas H.H. (1991).** Dairy nutrition management. Vet Clin North Am, Food Anim. Pract. 7: 632.
90. **Taweel H.Z., Tas B.M., Dijkstra J., Tamminga S. (2004).** Intake regulation and grazing behavior of dairy cows under continuous stocking. J. Dairy Sci. 87: 3417-3427.
91. **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.

92. **Tebot I., Cajarville C., Repetto J.L., Cirio A. (2012).** Supplementation with non-fibrous carbohydrates reduced fiber digestibility and did not improve microbial protein synthesis in sheep fed fresh forage of two nutritive values. Anim. 6: 617-623.
93. **Trevaskis L.M., Fulkerson W.J., Gooden J.M. (2001).** Provision of certain carbohydrate-based supplements to pasture-feed 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.
94. **Tripathi M. K., Santra A., Chaturvedi O. H., Karim S. A. (2004).** Effect of sodium bicarbonate supplementation on ruminal fluid pH, feed intake, nutrient utilization and growth of lambs fed high concentrate diets. Anim. Feed Sci. Tech. 111: 27-39.
95. **Van Soest P.J. (1994).** Nutritional ecology of the ruminant. Ithaca, Cornell. University Press, 476p.
96. **Van Soest P.J., Robertson J.B., Lewis B.A. (1991).** Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and non starch polysaccharides in relation to animal nutrition. J. Dairy Sci. 74: 3583-3597.
97. **Voelker J.A., Allen M.S. (2003).** Pelleted beet pulp subtituted for high-moisture corn: Effects on ruminal fermentation, pH and microbial protein efficiency in lactating dairy cows. J. Dairy Sci. 86: 3562-3570.
98. **Wheeler W.E. (1980).** Gastrointestinal tract pH enviroment and the influence of buffering materials on the performance of ruminants. J. Anim. Sci. 51: 224-235.
99. **Yokoyama M.T., Johnson K.A. (1993).** Microbiología del rumen e intestino delgado. En: Church, D. C. (Ed). El rumiante, fisiología y nutrición. Zaragoza, Acribia, p.p. 137-157.