

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**Evaluación de la actividad del líquido ruminal de vacas alimentadas con ración totalmente mezclada y forraje fresco mediante la técnica de producción de gas *in vitro***

**“por”**

ROSAS, Feliciano  
IRIARTE, Enrique

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

MODALIDAD Ensayo Experimental

**MONTEVIDEO  
URUGUAY  
2014**

## PÁGINA DE APROBACIÓN

TESIS aprobada por:

Presidente de Mesa:

\_\_\_\_\_  
MSc., DMTV. Alejandro Britos

Segundo Miembro (Tutor):

\_\_\_\_\_  
MSc., Ing. Agr. Alejandro Mendoza

Tercer Miembro:

\_\_\_\_\_  
MSc., DMTV. Islamey Tebot

Co-tutor:

\_\_\_\_\_  
MSc., DMTV. Sebastián Brambillasca

Fecha:

25 de noviembre de 2014

Autores:

\_\_\_\_\_  
Luis Feliciano Rosas Ariz

\_\_\_\_\_  
Enrique Iriarte Chebataroff

## **AGRADECIMIENTOS**

A nuestras familias, amigos, compañeros, y todas aquellas personas que nos ayudaron y brindaron su apoyo durante toda la carrera universitaria, lo que ha sido de fundamental importancia para desarrollarnos como seres humanos y futuros profesionales.

Al Ing. Agr. Alejandro Mendoza por su tutoría. A la Dra. Cecilia Cajarville y Dr. Sebastián Brambillasca por su cotutoría en este trabajo y el respaldo brindado hacia nosotros.

A todos los integrantes del Departamento de Bovinos y Nutrición Animal de Facultad de Veterinaria, por ayudarnos en los trabajos de campo y laboratorio que fueron necesarios para poder realizar este ensayo.

A todos los compañeros con los que compartimos el trabajo experimental y a todo el personal del Campo Experimental N° 2 (Libertad) de la Facultad de Veterinaria, que facilitaron para que nuestro trabajo se pudiera llevar adelante.

## LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

	Página
Cuadro I. Composición (%) MS de la RTM utilizada.....	16
Cuadro II. Composición química de la pastura y la RTM.....	16
Cuadro III. Composición química de los sustratos utilizados.....	17
Cuadro IV. Parámetros de producción de <i>gas in vitro</i> de sustratos incubados con líquido ruminal de vacas alimentadas con RTM y forraje fresco.....	20

	Página
Figura I. Volumen total de gas producido (V ml/g MS incubada) en función del tiempo (h) obtenido por el modelo exponencial simple con latencia.....	11
Figuras II. Producción potencial de gas a partir de pastura o heno de alfalfa, o paja de trigo, cuando son incubados con líquido ruminal proveniente de vacas alimentadas solo con ración totalmente mezclada (RTM0), o con 4 (RTM4) u 8 (RTM8) horas de acceso a un forraje fresco (raigrás anual).....	21

## TABLA DE CONTENIDOS

	Página
<b>PÁGINA DE APROBACIÓN</b> .....	<b>II</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>III</b>
<b>LISTA DE CUADROS Y FIGURAS</b> .....	<b>IV</b>
<b>1. RESUMEN</b> .....	<b>1</b>
<b>2. SUMMARY</b> .....	<b>2</b>
<b>3. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>3</b>
<b>4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>5</b>
4.1 DIGESTIÓN RUMINAL.....	5
4.2 LAS PASTURAS TEMPLADAS COMO BASE DE LA ALIMENTACIÓN DE VACAS LECHERAS .....	7
4.3 LA UTILIZACIÓN DE RTM CON INCLUSIÓN DE PASTURAS EN LA ALIMENTACIÓN DE VACAS LECHERAS.....	8
4.4 USO DE LA TÉCNICA DE PRODUCCIÓN DE GAS <i>IN VITRO</i> EN INVESTIGACIÓN DE PRODUCCIÓN ANIMAL.....	10
<b>5. OBJETIVOS</b> .....	<b>13</b>
5.1. OBJETIVO GENERAL.....	13
5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	13
<b>6. HIPÓTESIS</b> .....	<b>14</b>
<b>7. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>15</b>
7.1. ANIMALES Y MANEJO .....	15
7.2. DISEÑO Y PERÍODO EXPERIMENTAL.....	15
7.2.1. Tratamientos .....	15
7.2.2. Alimentos .....	15
7.3. DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE GAS <i>IN VITRO</i> .....	17
7.4 DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS ALIMENTOS .....	18
7.5. CÁLCULOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	18
<b>8. RESULTADOS</b> .....	<b>19</b>
<b>9. DISCUSIÓN</b> .....	<b>23</b>
9.1. PRODUCCIÓN POTENCIAL DE GAS.....	23
9.2. TASA FRACCIONAL DE PRODUCCIÓN DE GAS.....	24
9.3. TIEMPO DE RETARDO.....	24
<b>10. CONCLUSIONES</b> .....	<b>26</b>
<b>11. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>27</b>

## 1. RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad fermentativa del líquido ruminal de vacas alimentadas con una dieta base ración totalmente mezclada (RTM) con adición o no de una pastura templada de alta calidad. Para ello se usaron 9 vacas Holstein multíparas al inicio de lactancia con peso vivo de  $572 \pm 76$  kg y una producción en la lactancia anterior de  $7079 \pm 1226$  litros, fueron alojadas en bretes con comederos individuales. Los animales fueron asignados a tres dietas de acuerdo a un diseño de cuadrado latino  $3 \times 3$  por triplicado. Las dietas consistieron en RTM *ad libitum* 24 horas (T0), libre acceso a una pastura (*Lolium multiflorum*) por 4 horas más libre acceso a RTM por 20 horas (T4) y pastura por 8 horas más RTM por 16 horas (T8). La pastura fue cortada diariamente y ofrecida fresca. Cada período experimental consistió en 10 días de adaptación más 10 días de toma de muestras. El último día de cada período de mediciones se obtuvieron muestras de líquido ruminal de cada animal, con el que se incubaron muestras de distintos forrajes, y se midió la producción de gas *in vitro*. Se observó un aumento significativo en la producción potencial de gas cuando se incubó paja de trigo en líquido ruminal obtenido de vacas en RTM4 respecto a RTM0, pero no hubo diferencias entre inóculos cuando el sustrato fue heno o pastura de alfalfa. No se observaron diferencias entre inóculos en la tasa fraccional de producción de gas a partir de los sustratos incubados, pero el tiempo de retardo en la producción de gas fue mayor en RTM4 en comparación con RTM8. Se concluye que, a excepción del tiempo de retardo, el tiempo de acceso a un forraje fresco de alta calidad en vacas alimentadas con una RTM no tuvo efectos marcados sobre los parámetros de producción de gas *in vitro*.

## 2. SUMMARY

The aim of this study was to evaluate the fermentative activity of the rumen fluid of cows fed a total mixed ration (RTM) diet with the addition or not of a temperate pasture, through an *in vitro* gas production approach. Nine multiparous Holstein cows in early lactation (BW: 572 ± 76 kg; previous lactation: 7079 ± 1226 liters) were assigned to 3 treatments according to a 3 x 3 Latin square design. The treatments consisted in *ad libitum* RTM (T0), free access to a pasture (*Lolium multiflorum*) during 4 h + free access to TMR during 20 h (T4), and free access to the same pasture during 8 h + free access to TMR during 16 h (T8). The pasture was daily cut and offered to animals. Each experimental period consisted in 10-day diet adaptation phase, plus 10 days for measurements. The last day of each experimental period, samples of ruminal fluid were obtained, used to incubate samples from different forages and *in vitro* gas production was measured. The gas production when wheat straw was incubated with ruminal fluid from cows fed RTM4 was higher than when it was incubated with ruminal fluid from RTM0 treatment; no differences were noted among inocula when alfalfa or hay were incubated. The fractional rate of gas production were similar among ruminal fluids, but lag time of gas production was higher in the RTM4 than in the RTM8 treatment. In conclusion, the time of access of a high quality fresh forage in cows fed RTM based diets had no remarkable effects on gas *in vitro* fermentation kinetics.

### 3. INTRODUCCIÓN

Los sistemas de producción de rumiantes en Uruguay tienen la característica de ser fundamentalmente pastoriles. La producción de leche se ha basado tradicionalmente en el pastoreo directo de gramíneas y leguminosas forrajeras, asociado al uso de suplementos como concentrados y/o forrajes conservados, para diferirlos a los momentos de déficit de forraje (Mendoza y col., 2011). En dichos sistemas, la utilización de pasturas es importante desde el punto de vista nutricional, y al mismo tiempo reduce de manera importante los costos de producción (Cajarville y Repetto, 2005). Sin embargo, distinta información colectada en condiciones comerciales sugiere que estos tipos de dieta normalmente no permiten explotar el potencial genético de producción de leche de los animales (Mendoza y col., 2011).

Los sistemas productivos con alta proporción de pasturas son amigables con el ambiente, los productos animales obtenidos son más sanos para el hombre, pero tienen limitantes para satisfacer los requerimientos de animales de alta producción, ya que muchas veces con una dieta basada principalmente en pasturas no podemos explotar el potencial genético de nuestros animales. La información generada a nivel nacional en sistemas de producción de leche sugiere, que es imprescindible seguir avanzando en cambios tecnológicos para llegar a nuevos horizontes productivos manteniendo la competitividad (Durán, 2004). De ésta información se sugiere que a partir de la utilización de pasturas, concentrados y reservas por separado, quedaría escaso margen para aumentar de forma significativa los niveles de producción, por lo que se debería recurrir a otras alternativas para seguir intensificando la producción de leche.

En Países del hemisferio norte (EEUU y Europa) se utilizan sistemas de confinamiento con dietas del tipo ración totalmente mezclada (**RTM**), que son aquellas en las que concentrados, forrajes y aditivos se mezclan de forma homogénea, y de esta manera son ofrecidas a los animales (Coppock y col., 1981). Con este tipo de dieta, cada bocado de alimento que consume la vaca contiene la cantidad correcta de ingredientes para una ración balanceada, permitiendo a la vaca consumir lo más cercano a sus requerimientos nutricionales diarios y mantener las características físicas necesarias para la función adecuada del rumen. Eso produce un ambiente más estable en el rumen y se equilibra el balance de nutrientes en una forma más eficiente. Este sistema de alimentación presenta varias ventajas como por ejemplo, a) maximizar el consumo individual, b) ofrecer una dieta con un aporte balanceado de nutrientes y una óptima relación forraje-concentrado, c) minimizar la selectividad por componentes individuales y d) lograr una mayor independencia de las variaciones climáticas (Lammers y col., 2002). Esto conllevaría a un aumento de la producción individual y facilitaría la tarea del nutricionista para balancear una dieta más precisa que cuando se ofrecen los ingredientes por separado.

El uso de RTM presenta algunas desventajas que deben ser tenidas en cuenta al adoptar esta tecnología. Por ejemplo requiere el uso de algún tipo de equipo para la mezcla y la distribución del alimento, así como instalaciones para la alimentación de los



animales (corrales o patio de alimentación), para el tratamiento de los efluentes generados y para el almacenamiento de los alimentos a usar (Lammers y col., 2002). Por otra parte es recomendable realizar lotes de animales según productividad para un mayor aprovechamiento de la ración, lo que trae inconvenientes en pequeños productores y/o donde hay poca mano de obra disponible (Coppock y col., 1981).

En Uruguay existe poca información sobre la utilización de un sistema RTM con inclusión de pasturas, por lo que es de vital importancia debido a la creciente competencia e intensificación de los procesos de producción. Se debería generar información al respecto sobre un sistema que pueda adaptarse a los tiempos actuales y llevar a un mayor desarrollo de la lechería uruguaya. Los estudios extranjeros reportan que el pasaje de un sistema de tipo RTM a uno con inclusión de pasturas va acompañado de una reducción en la producción de los animales (Kolver y Muller, 1998).

Por ejemplo, Morales y col. (2010) utilizando una dieta RTM como base, compararon los efectos del incremento del tiempo de acceso a una pastura mezcla de gramíneas y leguminosas (0, 6 o 12 horas), observaron que el consumo de pastura aumentó y el de RTM disminuyó a mayor tiempo de acceso a pastura, pero el resultado neto fue que no hubo diferencias entre tratamientos con respecto a la producción de leche. Vibart y col. (2010) usando métodos *in vitro*, reportaron que el incremento de la proporción de raigrás anual en una dieta RTM (desde 40 a 67%) redujo la producción de metano y aumentó la eficiencia de síntesis de proteína microbiana ruminal, lo que sugiere un mejor aprovechamiento del nitrógeno a nivel de rumen en dietas que incluyen pasturas. Sus resultados mostraron que se puede sustituir casi la mitad de la RTM total de una dieta, sin tener un efecto negativo sobre la función del rumen y la producción de proteína microbiana.

Las técnicas de fermentación de gas *in vitro* fueron diseñadas con el propósito de evaluar alimentos en forma más rápida, menos costosa y utilizando un menor número de animales. Permiten determinar la magnitud y la cinética de fermentación del alimento a través del volumen de gas producido durante el proceso fermentativo (Theodorou y col., 1994). La determinación de los parámetros de la cinética de producción de gas de un alimento al ser incubado con líquido ruminal obtenido de animales alimentados con distintas dietas, también permite evaluar la actividad fermentativa de la población microbiana en cada uno de estos inóculos (Bruni y col., 2001).

Específicamente, en este trabajo interesa saber cómo el uso de dietas que combinan RTM y forraje fresco afecta la actividad fermentativa del líquido ruminal (lo que se relacionaría con el aporte y utilización de nutrientes a nivel de rumen), la que será medida a través de la técnica de producción de gas ruminal *in vitro*.

## 4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 4.1. DIGESTIÓN RUMINAL

El rumen es considerado un ecosistema abierto y continuo, que proporciona un ambiente ideal para el mantenimiento de una población microbiana estable. El medio es anaeróbico, con temperatura en torno a los 39-42°C, pH entre 6,0 y 7,0 y con presencia permanente de sustratos y de actividad fermentativa (Kozloski, 2002).

La población microbiana ruminal es la responsable de aprovechar el alimento que consume el rumiante (Schingoethe, 1996). Los rumiantes poseen un sistema de fermentación microbiana de los alimentos previo a la acción de las propias enzimas digestivas (Owens y Goetsch, 1988). En comparación con otros herbívoros, los rumiantes tienen el mayor potencial para obtener los nutrientes de los alimentos fibrosos. La digestión de los hidratos de carbono de fibra en el rumen requiere la adhesión microbiana a las partículas del forraje (Cheng y col., 1977). Los microorganismos del rumen fermentan el alimento que llega al mismo aportando no solo proteína microbiana si no también ácidos grasos volátiles (AGV), que luego son aprovechados por el rumiante.

En los sistemas pastoriles la principal fuente de energía para los rumiantes es la fibra, que se digiere por un consorcio de microorganismos anaerobios que residen en el rumen. Las poblaciones bacterianas en el rumen determinan en gran medida el grado y velocidad de degradación de la fibra, pero también son importantes el pH del rumen, junto con la población microbiana, la naturaleza de los sustratos, los factores ambientales tales como la temperatura y la existencia de cationes y los hidratos de carbono solubles se han sugerido como factores que regulan la fijación bacteriana (Miron y col., 2001)

Como se explicó anteriormente el alimento fermentado en rumen produce AGV. Cuando la dieta contiene grandes cantidades de forraje, los carbohidratos fermentados se convierten en 65% ácido acético, 20% ácido propiónico y 15% ácido butírico (Dehority, 1987). En este proceso también se produce dióxido de carbono, metano, amoníaco y en ocasiones ácido láctico (Mackie y White, 1990). El ecosistema del rumen consiste principalmente de bacterias ( $10^{10}$ - $10^{11}$  células/mL), protozoarios ( $10^4$ - $10^6$ /mL), hongos anaeróbicos, ( $10^3$ - $10^5$  zoospora/ml) y bacteriófagos ( $10^8$ - $10^9$ /ml) (Kamra, 2005).

Estas poblaciones de microorganismos varían según la dieta del animal, y al variar estas, varían también los AGV producidos. Por ejemplo, en dietas ricas en forrajes predominan las bacterias celulolíticas, que preferencialmente fermentan celulosa y hemicelulosa, dando como producto final ácido acético, mientras que en dietas ricas en concentrados predominan las bacterias amilolíticas, que fermentan almidón principalmente, lo que resulta en una orientación de la fermentación hacia una mayor producción de ácido propiónico (Van Soest, 1994).

El valor nutritivo de un alimento está relacionado con la composición química y el grado de aprovechamiento de los nutrientes. La asociación entre el animal y los microorganismos del rumen permiten el aprovechamiento de los carbohidratos tanto como los estructurales como los no estructurales. Del alimento consumido no todo se va a aprovechar, esto va a depender de la rapidez de fermentación y el tiempo de permanencia del mismo en rumen, por lo tanto la fracción efectivamente degradada es en función de la tasa de pasaje y la tasa de digestibilidad (Tomich y col., 2003).

Los carbohidratos de la dieta se dividen en monosacáridos, oligosacáridos y polisacáridos como el almidón, celulosa, hemicelulosas y pectinas (McDonald, 2006). En el rumen los polisacáridos son degradados por sistemas enzimáticos asociados a las membranas de las bacterias. Solamente moléculas conteniendo una, dos o hasta 3 unidades monoméricas resultantes de la hidrólisis de los polisacáridos son entonces transportadas al interior de la célula bacteriana donde serán metabolizadas (Silva de Oliveira y col., 2007).

En el caso de los carbohidratos estructurales la celulosa se hidroliza por endo y exocelulasas bacterianas (o microbianas) que atacan los enlaces  $\beta$  1-4 dentro y en el final de la cadena del polímero dando como producto final la liberación de glucosa y celobiosa. La digestión de la hemicelulosa es compleja y se asocia a otros componentes de la pared celular tales como lignina, variando con el tipo de forraje, y con el tejido de la misma planta. La lignificación de la pared celular vegetal ha sido considerada como el principal impedimento a la digestibilidad del forraje (Jung y col., 1997). El producto final de la hidrólisis de la hemicelulosa por las enzimas bacterianas es xilosa, xilobiosa y arabinosa (Church, 1993). En los carbohidratos no estructurales, el almidón es hidrolizado por amilasas de tipo  $\alpha$  y  $\beta$  y también isoamilasas. La  $\alpha$ -amilasa hidroliza enlaces dentro de las cadenas (endoglicosidasas), liberando maltosa con el producto final. La función de la  $\beta$ -amilasa en el extremo de la cadena (exoglicosidasas) es liberar glucosa. Las isoamilasas hidrolizan los enlaces  $\alpha$ -1,6 en los puntos de ramificación del polímero (Hobson y Stewart, 1987).

En comparación con la sacarosa o el almidón, la degradación en el rumen de los hidratos de carbono de la pared celular es más lento y menos extensa (Van Soest, 1994). Por lo tanto, los rumiantes que consumen forrajes a menudo requieren la suplementación con energía para lograr niveles aceptables de producción. Sin embargo, la suplementación con alimentos ricos en almidón a menudo disminuye la ingesta de forraje y la digestibilidad de la fibra (Paterson y col., 1994).

En cuanto a la síntesis de proteína microbiana se necesitan sustratos energéticos para poder aprovechar el N disponible en el rumen. Además dichos nutrientes deben estar disponibles en forma sincrónica (Valkeners et al., 2006). Esta proteína es altamente digestible, de muy alta calidad y con una composición en aminoácidos muy estable (Schingoethe, 1996). No obstante, algunos autores ponen en duda este concepto, ya que argumentan que el propio sistema ruminal tendría la capacidad para hacer frente a desfases moderados en la oferta de nitrógeno y sustratos energéticos. Por ejemplo, los microorganismos del rumen no disponen solamente del nitrógeno dietario que se

degrada en el rumen, sino que además pueden usar el nitrógeno no proteico de la urea recirculante proveniente por sangre y por saliva, dependiendo de la disponibilidad de nitrógeno a nivel ruminal (Hall y Huntington, 2008).

#### 4.2. LAS PASTURAS TEMPLADAS COMO BASE DE ALIMENTACIÓN DE VACAS LECHERAS.

La producción de leche en Uruguay se ha basado tradicionalmente en el pastoreo directo de gramíneas y leguminosas, asociadas al uso de suplementos como concentrados y/o forrajes conservados para los momentos de déficit forrajeros (Mendoza y col., 2011). Estas especies forrajeras que se utilizan en los sistemas intensivos de producción animal están representados principalmente por gramíneas C3, leguminosas y sus mezclas (Repetto y Cajarville, 2009). En términos generales, este tipo de pasturas juega un importante rol en la alimentación del ganado, tanto desde el punto de vista nutricional como económico. Adicionalmente, se considera que los sistemas pastoriles pueden tener beneficios sobre la salud de los animales, respecto a sistemas de confinamiento, y desde este punto de vista promoverían un mayor bienestar de los mismos. Desde el punto de vista del consumidor, la leche producida por vacas alimentadas con pasturas presentan características nutricionales deseables para la salud humana, particularmente en lo que refiere al perfil de ácidos grasos que componen la grasa de la leche (Rushen y col., 2008).

En Uruguay, Caramelli y col. (2008) reportaron la composición química de pasturas puras de gramíneas y leguminosas de alta calidad provenientes de más de 40 parcelas de predios comerciales. Las mismas fueron cortadas cuando se consideraba que estaban en un estado adecuado para ser pastoreadas, siendo la composición promedio la siguiente (base seca): 18% de materia seca (MS), 19% de proteína bruta, 40% de fibra detergente neutro (FDN) y 8% de azúcares, características que están de acuerdo con lo que se considera una pastura de alta calidad (Bargo y col., 2002c). Como resultado de las características químicas de estas pasturas, la fermentescibilidad de las mismas al medirla a través de la producción de gas *in vitro* fue elevada respecto a la producción que se obtiene, por ejemplo, a partir de forrajes conservados (Caramelli y col., 2008).

Otros trabajos hechos por los Departamentos de Bovinos y Nutrición de Facultad de Veterinaria señalan que si los bovinos u ovinos consumen únicamente estas pasturas templadas de alta calidad, la cantidad de N degradable en la dieta, que aporta NH<sub>3</sub> al rumen, no sería limitante para un óptimo crecimiento microbiano, que se ha establecido en 5 a 9 mg/dL (Van Soest, 1994). Las concentraciones de NH<sub>3</sub> ruminales en estos trabajos nacionales fueron de 20,1 mg/dL en promedio (Repetto y Cajarville, 2009). No obstante, la alta degradabilidad ruminal de las paredes celulares (55 a 70%) lleva a que se produzcan grandes cantidades de AGV, lo cual puede causar una disminución marcada del pH en el rumen hasta niveles considerados de acidosis (<5,5) (Cajarville y Repetto, 2005).

Sin embargo, dietas basadas exclusivamente en este tipo de pasturas no permitiría explotar el potencial genético de producción de leche de los animales que se utilizan. En Uruguay hace varias décadas que se viene llevando a cabo un mejoramiento genético animal con material proveniente de EEUU y Canadá, teniendo como principal objetivo de selección mayor producciones de leche; sin embargo, la información internacional muestra que este mayor potencial productivo no va acompañado de mayores consumos. Por este motivo para expresar este potencial sería necesario administrar dietas con mayor concentración de nutrientes (Eastridge, 2006).

#### 4.3 LA UTILIZACIÓN DE RTM CON INCLUSIÓN DE PASTURAS EN LA ALIMENTACIÓN DE VACAS LECHERAS.

Con las estrategias de alimentación que se utilizan en nuestros predios comerciales, en la cual pasturas y concentrados se suministran por separado, sería cada vez más difícil lograr un aumento considerable en las producciones individuales. En este sentido, la utilización de confinamiento en combinación con el uso de pasturas de alta calidad sería una estrategia de alimentación a desarrollar en nuestros sistemas de producción con el objetivo de incrementar de forma sustancial la productividad de un predio (Durán, 2004).

Las RTM son un sistema de alimentación donde los forrajes y alimentos concentrados son completamente mezclados, y de esta forma son ofrecidos a los animales (Mendoza y col., 2011). Esto permite consumir lo más cercano a los requerimientos de energía que sea posible y mantener las características físicas necesarias para la función apropiada del rumen. Estos sistemas cuentan con ventajas como: 1) no es necesario suplementar en la sala de ordeño, por lo tanto parte de los costos de construcción se reducen, además las vacas son más silenciosas durante el ordeño, al parecer defecan menos, y a su vez el movimiento a través de la sala es más rápido (Coppock y col., 1981); 2) maximiza el consumo individual; 3) aporta una dieta balanceada en nutrientes; 4) minimiza la selectividad por componentes individuales; 5) disminuye la incidencia de problemas digestivos y metabólicos. En conjunto, esto promovería el incremento de la producción individual de los animales, y facilitaría la tarea de formular una dieta más precisa que cuando se ofrecen los ingredientes por separado (Lammers y col., 2002). Como desventajas podrían considerarse la necesidad de contar con equipo e instalaciones para el almacenamiento, mezclado y distribución del alimento, y para el tratamiento de los efluentes generados.

Desde un punto de vista general, la utilización del confinamiento podría realizarse de forma coyuntural, por ejemplo, solamente durante períodos de escasez de forraje, como forma de mantener la oferta total de alimentos para los animales. También sería posible concebir su uso de manera sistemática, en cuyo caso sería interesante la identificación de una combinación pastura – RTM como alternativa al tradicional uso de concentrados y reservas forrajeras por separado como estrategia de intensificación de la producción de leche. Por una parte, el uso de una RTM permitiría: a) formular con precisión una dieta balanceada, b) incrementar el consumo total de nutrientes, lo que permitiría aumentar la producción individual, y d) lograr una mayor independencia de

las variaciones climáticas, que son quienes determinan la producción de forraje de un predio. Adicionalmente, permitiría un mayor control de los pastoreos, lo que posibilitaría: a) usar de forma más eficiente este recurso durante épocas de escasez de forraje, lo que permitiría incrementar la dotación animal, y por tanto, la productividad por unidad de superficie; b) aumentar la eficiencia de uso de la pastura, al minimizar los efectos negativos de los animales sobre las mismas, como el pisoteo; c) aprovechar las ventajas intrínsecas que brinda la inclusión de pasturas en la dieta en términos de calidad de producto y bienestar animal.

En un experimento realizado por Vibart y col., (2008) se reportó que el aumento de la inclusión de raigrás anual en estado vegetativo en una dieta de tipo RTM de 21 a 41% no afectó la producción de leche en vacas, mientras que con la misma pastura pero en un estado más avanzado de madurez, el aumento de su proporción de 11 a 35% redujo el consumo total, la producción de leche y proteína. En ambos casos, la concentración de ácidos grasos en leche beneficiosos para la salud humana (ej. Ácido ruménico y vaccénico) aumentó a medida que aumentó el nivel de inclusión de pastura. En este trabajo no se realizaron mediciones de fermentación ruminal ni de digestión y metabolismo de nutrientes, que son necesarios para explicar la respuesta productiva de los animales ante variaciones en la ingesta de nutrientes con este tipo de dietas. Sin embargo, los mismos autores, usando métodos *in vitro*, reportaron que el incremento de la proporción de raigrás anual en una dieta RTM (desde 40 a 67%) redujo la producción de metano y aumentó la eficiencia de síntesis de proteína microbiana ruminal, lo que sugiere un mejor aprovechamiento del nitrógeno a nivel de rumen en dietas que incluyen pasturas (Vibart y col., 2010).

En otro experimento realizado por Bargo y col., (2002a) se evaluaron tres dietas: a) RTM, b) pastura (mezcla de gramíneas templadas) + RTM, c) pastura + concentrado. Estos investigadores reportaron que la concentración de  $\text{NH}_3$  ruminal fue menor en los tratamientos RTM y pastura + RTM respecto a pastura + concentrado, pero no se detectaron diferencias en pH, concentración o perfil de AGV. Adicionalmente, las vacas alimentadas con RTM produjeron la mayor cantidad de leche, grasa y proteína, asociado a un mayor consumo de energía, y las del tratamiento pastura + concentrado la menor, siendo el tratamiento pastura + RTM intermedio. Sin embargo, el contenido de ácidos grasos beneficiosos para la salud humana en la leche, incluyendo al ácido ruménico y trans-vaccénico, aumentó con la mayor proporción de pastura en la dieta (Bargo y col., 2002). Los cambios en el perfil de metabolitos plasmáticos sugieren que, en comparación con las vacas alimentadas con pastura + concentrado, las alimentadas con pastura + RTM tuvieron un mayor aprovechamiento del nitrógeno ingerido y una menor movilización de reservas corporales, asociado a un mejor balance de energía (Bargo y col., 2002b).

Soder y col (2013) realizaron un trabajo experimental comparando 3 dietas en un sistema fermentador de cultivo continuo de doble flujo donde se evaluó la digestibilidad de nutrientes, el perfil de fermentación, y la síntesis de N bacteriano. Las dietas evaluadas consistían en: 1) 100% pasto ovillo, 2) 100% TMR y, 3) 50% de pasto ovillo suplementado con 50% TMR. Se observó que, comparada con la dieta 100% pasto

ovillo, la dieta 100% TMR disminuyó la digestibilidad de la FND, mientras que la dieta con 50% TMR redujo la digestibilidad de la materia seca, materia orgánica y fibra detergente neutro, lo que sugiere que la sustitución de forraje fresco altamente digestible con TMR probablemente causa depresiones en la digestibilidad de los nutrientes. La concentración de ácidos grasos volátiles totales, y las proporciones molares de acetato, propionato, e isovalerato, así como la relación acetato:propionato fueron significativamente más altos en la dieta 100% TMR en comparación con solo pastura, probablemente en respuesta al aumento del suministro de energía fermentable. El tipo de alimento no afectó el metabolismo de N.

#### 4.4. TÉCNICA DE PRODUCCIÓN DE GAS *IN VITRO* EN INVESTIGACIÓN EN NUTRICIÓN ANIMAL.

Según Van Soest (1994), las características de fermentación de los alimentos en el rumen pueden ser estudiadas por métodos *in vivo* o *in vitro*. Las técnicas de fermentación *in vitro* se desarrollaron con el fin de evaluar los alimentos con un número menor de animales, de forma menos costosa y más rápida.

La técnica de producción de gas *in vitro* permite estimar de manera precisa los cambios de la fermentación ruminal. Determina la magnitud y la cinética de fermentación del alimento a través del volumen de gas producido durante el proceso fermentativo (Theodorou y col., 1994). La técnica se basa en la suposición de que el gas producido en cultivos discontinuos es sólo la consecuencia de la fermentación de una cantidad dada de sustrato (France et al., 2000). En términos generales, la técnica de producción de gas al igual que otros procedimientos *in vitro*, utilizan sustratos (alimentos) molidos, medios buffer, inóculos que contienen microorganismo viables (ej. líquido ruminal, heces) y temperatura de incubación de 39° C (Williams, 2000). Existen métodos manuales, semiautomáticos y automáticos para la medición de la producción de gas a presión y volumen constante (Rymer y col., 2005).

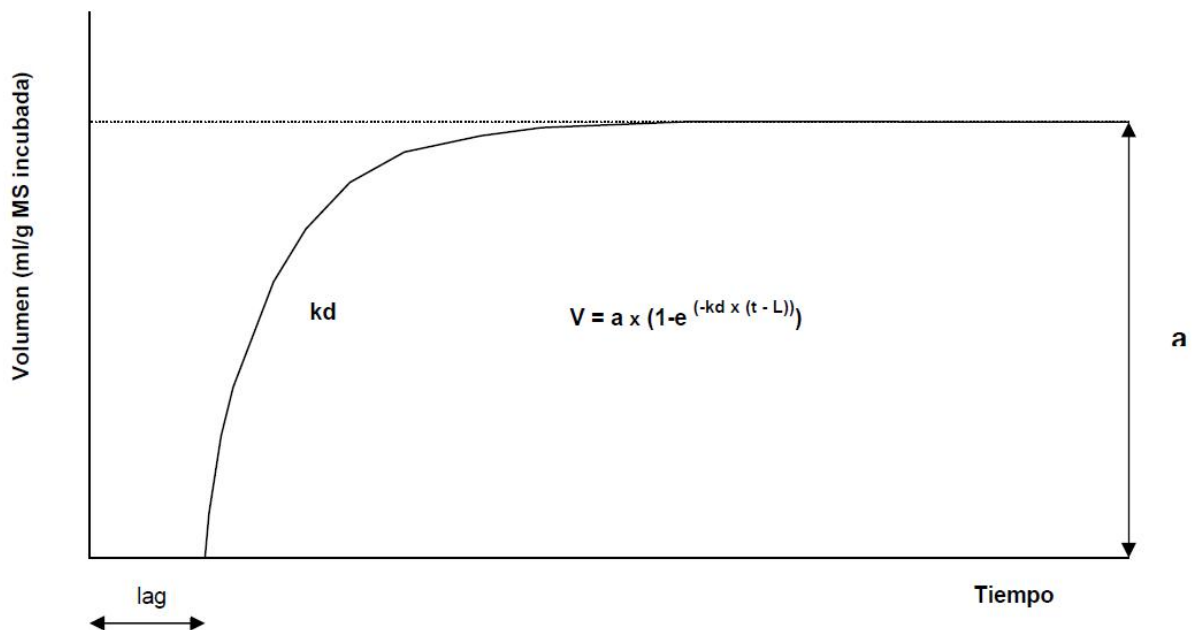
Las principales ventajas de la técnica de producción de gas están dadas por el bienestar animal, tamaño de la muestra, el costo y la descripción de la cinética de fermentación. Como desventaja se menciona la falta de uniformidad en las metodologías, lo que dificulta la comparación de resultados entre grupos de investigación (Williams, 2000). Diferentes fuentes de variación generan impactos sobre la producción de gas *in vitro*. El nivel de presión acumulada, los cambios de presión atmosférica, la agitación del medio, el tamaño de la muestra y su preparación, efectos del tipo de inóculos y la dieta de los animales donantes, especie del animal donante, composición del medio de cultivo, nivel de nitrógeno en el medio, tipos de aparatos usados y sistemas de evaluación, son algunos de los mencionados (Rymer y col., 2005).

A través de esta técnica también es posible investigar efectos asociativos entre alimentos. Liu y col. (2002) realizaron estudios de dietas por separado y luego asociadas, monitoreando la producción de gas *in vitro* y la interacción entre alimentos,

y reportaron que la técnica es lo suficientemente sensible como para detectar efectos asociativos tanto positivos como negativos.

Nagadi y col. (2000) realizaron un trabajo experimental en ovinos donde estudian la influencia de la dieta del animal donante en la concentración bacteriana inicial del líquido ruminal y en los parámetros de degradabilidad de producción de gas in vitro. Utilizaron tres dietas combinando concentrados y forraje, 20:80 dieta 1, 40:60 dieta 2, 80:20 dieta 3, respectivamente. Concluyeron que el cambio de la relación concentrado a heno reduce la concentración bacteriana inicial y afecta a los parámetros de degradabilidad de producción de gas.

El análisis de los datos obtenidos a partir de la técnica se basa en modelos matemáticos para estimar el índice y grado de digestión acumulativa de los alimentos a partir de la producción de perfiles de gas (López y col., 2007). Las curvas de producción de gas obtenidas pueden ser ajustadas a diferentes modelos matemáticos (Posada y Noguera, 2007). La descripción estadística por modelos matemáticos de las curvas de producción de gas permite la comparación de los sustratos, la evaluación de diferentes ambientes de fermentación y proporciona información sobre las tasas de fermentación de los constituyentes (Noguera y col., 2004). En este trabajo se utilizó el modelo exponencial simple con latencia planteado por Ørskov y McDonald (1979), el cual supone que la tasa de producción de gas es constante y que depende del sustrato disponible una vez alcanzado el tiempo de colonización (figura 1).



**Figura I.** Volumen total de gas producido (V ml/g MS incubada) en función del tiempo (h) obtenido por el modelo exponencial simple con latencia. L: tiempo de retardo en la producción de gas (h); a = volumen de gas a un tiempo t (ml/g MSi); kd = tasa de producción de gas ( $h^{-1}$ ); t = tiempo de incubación (h). Fuente: elaboración propia.



Para la selección del modelo se toma en cuenta la capacidad de ajuste de los datos obtenidos al mismo, la cual es evaluada a través de herramientas estadísticas. Los mejores modelos son aquellos que presentan el mejor balance entre la capacidad de ajuste de los datos y la coherencia biológica, siendo necesaria su evaluación en las más variadas condiciones experimentales, a fin de escoger el mejor para cada situación (Posada y Noguera, 2007). En el caso del modelo propuesto por Ørskov y McDonald (1979), se distingue una fase inicial de incubación donde ocurre la hidratación del sustrato y su colonización por los microorganismos ruminales. Posteriormente, en la fase exponencial el sustrato es saturado con microorganismos y enzimas, y durante la misma lo primero que se degrada es la parte más soluble del sustrato, y el sustrato menos digestible precisa de más tiempo para ser degradado. Finalmente, cuando la fracción potencialmente degradable ha sido digerida, la producción de gas tiende a cero y se llega a una asíntota que corresponde a la producción potencial de gas (Posada y Noguera, 2007).

La técnica de producción de gas in vitro es una metodología que permite simular las condiciones de fermentación del rumen, permitiendo estudiar diferentes aspectos de la fermentación ruminal y de la actividad fermentativa de la microbiota ruminal. Además, la versatilidad de la técnica es útil para evaluar diferentes combinaciones de alimentos y los efectos asociativos que se producen cuando estos alimentos componen las dietas. En base a esto, nos planteamos este trabajo, para estudiar el comportamiento fermentativo de la microbiota ruminal de vacas alimentadas con dietas basadas en RTM y pastura.

## **6. HIPÓTESIS**

La modificación de las horas de acceso a un forraje fresco de alta calidad, en vacas lecheras alimentadas con una dieta base de tipo RTM, determinará cambios en la actividad fermentativa del líquido ruminal cuando es evaluado a través de la técnica de producción de gas *in vitro*.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1. OBJETIVO GENERAL

- Evaluar el efecto del tiempo de acceso a una pastura de alta calidad, en vacas consumiendo una dieta base RTM sobre la capacidad fermentativa del líquido ruminal.

### 5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar los parámetros de la producción de gas *in vitro* cuando se incuban distintos forrajes con líquido ruminal procedente de bovinos alimentados con una dieta base RTM, y combinaciones de RTM y distintos tiempos de acceso a un forraje fresco de alta calidad.
- Estudiar si la inclusión de pasturas en la dieta de vacas lecheras alimentadas con una RTM modifica la producción de gas cuando se incuban forrajes con líquido ruminal obtenido de vacas alimentadas con una dieta RTM o combinaciones de RTM con distintos tiempos de acceso a un forraje fresco de alta calidad.

## 7. MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se realizó en la Unidad de Digestión y Metabolismo Ruminal de los Departamentos de Bovinos y Nutrición, del Campo Experimental N°2 de Facultad de Veterinaria, Libertad, San José, Uruguay.

### 7.1. ANIMALES Y MANEJO

Todos los procedimientos fueron aprobados por la Comisión de Bioética de Facultad de Veterinaria. Se utilizaron 9 vacas multíparas de la raza Holstein, con un peso vivo de  $572 \pm 76$  Kg. Al inicio del experimento los animales estaban a los  $100 \pm 25$  días de lactancia, y tuvieron una producción en la lactancia anterior de  $7079 \pm 1226$  litros. Los animales se alojaron individualmente en bretes, teniendo libre acceso al agua, y se le suministró alimento de la forma que se describe a continuación para cada tratamiento. Los animales se ordeñaron dos veces por día (0730 y 1900 horas).

### 7.2. DISEÑO Y PERÍODO EXPERIMENTAL

El diseño del experimento fue un cuadrado latino 3 x 3 replicado 3 veces. Los animales fueron bloqueados en 3 cuadrados según peso vivo, producción al inicio del experimento y en la lactancia previa, y dentro de cada cuadrado se asignaron al azar a tres tratamientos. Cada período experimental tuvo una duración de 20 días; los primeros 10 días de cada período fueron de adaptación a la dieta de los animales y los 10 restantes correspondieron a período de mediciones.

#### 7.2.1. Tratamientos

Los tratamientos evaluados fueron:

- T0: RTM *ad libitum*.
- T4: libre acceso a pastura por 4 horas más RTM por 20 horas.
- T8: libre acceso a pastura por 8 horas más RTM por 16 horas.

#### 7.2.2. Alimentos

Durante el experimento los animales consumieron una RTM compuesta por: ensilaje de maíz planta entera, grano de maíz seco partido, harina de soja, núcleo vitamínico-mineral (Cuadro I), elaborada según las normas NRC para vacas lecheras(2001), para satisfacer los requerimientos de vacas de 600 Kg produciendo 35 L de leche al día. La pastura que se utilizó fue raigrás anual (*Lolium multiflorum*), cultivar LE 284 (Cuadro II).

**Cuadro I. Ingredientes (% en base MS) de la ración totalmente mezclada utilizada en el experimento.**

	<b>Porcentaje (base seca)</b>
<b>Ensilaje de maíz</b>	45,2
<b>Grano de maíz</b>	31,6
<b>Harina de soja</b>	21,3
<b>Bicarbonato de sodio</b>	0,6
<b>Fosfato dicálcico</b>	0,4
<b>Urea</b>	0,3
<b>Carbonato de calcio</b>	0,2
<b>Cloruro de sodio</b>	0,2
<b>Oxido de magnesio</b>	0,2
<b>Premezcla de vitaminas y minerales traza<sup>1</sup></b>	0,04
<b>Secuestrante de micotoxinas<sup>2</sup></b>	0,04
<b>Monensina<sup>3</sup></b>	0,01

<sup>1</sup>Rovimix® Lecheras, DSM Nutritional Products Ltd. Basilea, Suiza

<sup>2</sup>Mycofix® Plus, Biomin Innovative Animal Nutrition GmbH, Herzogemburg, Austria

<sup>3</sup>Rumensin® 100 Premix, Elanco Animal Health, Greenfield, EEUU

**Cuadro II. Composición química (en base MS) de la pastura y RTM utilizadas en el experimento.**

	<b>Alimentos</b>	
	<b>RTM</b>	<b>Pastura</b>
<b>MS (%)</b>	38,0	13,4
<b>PB (%)</b>	16,8	22,1
<b>FDN (%)</b>	33,6	50,0
<b>FDA (%)</b>	16,4	24,0

MS %: materia seca; PB %: Proteína cruda; FDN %; Fibra detergente neutro; FDA %; Fibra detergente ácido;

RTM: Ración totalmente mezclada.

La pastura fue cortada diariamente durante la tardea 10 cm de altura y suministrada dentro de las siguientes 24 horas. La RTM se confeccionó diariamente a partir de las 0800 horas para luego ser suministrada en las siguientes 24 horas. Los animales comenzaban a ser alimentados a las 0900 horas.

Una vez que el comedero presentó un remanente cercano al 10% se procedía a la reposición del mismo. Al finalizar el plazo estipulado de alimentación con pastura de cada tratamiento, se procedía a retirar y pesar la que aún permanecía en el comedero, con el objetivo de calcular el rechazo de alimento de cada animal para de esta manera determinar el consumo.

### 7.3. DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE GAS *IN VITRO*

El último día de cada período experimental se colectó líquido ruminal de cada animal cuatro horas luego del inicio de la alimentación (1300 h), que posteriormente fue usado

como inóculo para incubar distintos sustratos. Los sustratos que se utilizaron fueron, pastura de alfalfa, heno de alfalfa y paja de trigo, y su composición química se presenta en el Cuadro III.

**Cuadro III. Composición química (en % base MS) de los sustratos utilizados en la técnica de producción de gas *in vitro*.**

	Pastura alfalfa	Heno alfalfa	Paja trigo
<b>MS (%)</b>	21,2	85,6	90,4
<b>MO (%)</b>	88,9	89,6	92,3
<b>PB (%)</b>	22,7	16,3	5,8
<b>FDN (%)</b>	44,5	45,6	66,0
<b>FDA (%)</b>	32,4	34,9	51,7

MS %: materia seca; MO %: Materia orgánica; PB %: Proteína cruda; FDN %; Fibra detergente neutro; FDA %; Fibra detergente ácido

Todas las muestras fueron incubadas con líquido ruminal fresco y se midió la producción de gas *in vitro*, siguiendo el procedimiento descrito por Theodorou y col. (1994), modificado por Mauricio y col. (1999). Se colocaron 0,5 g de cada sustrato (previamente secado y molido a 1 mm) en frascos de fermentación de 125 mL por duplicado. Se les adicionó 42,5 mL de un medio de incubación libre de nitrógeno, modificado de Williams y col. (2005), que se describe a continuación:

a) Solución basal: conteniendo 0,6g KCl, 0,6g NaCl, 0,2g CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0,5 MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1,46g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 3,55g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10mL de solución de Hemina y 10 mL de solución de minerales traza por cada 1L de agua destilada. La solución de minerales traza contenía: 0,025 g MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 0,020 g FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,025 g ZnCl<sub>2</sub>, 0,025 g CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0,050 g CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0,050 g SeO<sub>2</sub>, 0,250 g NiCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0,250 g Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0,0314 g NaVO<sub>3</sub>, y 0,250 H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>; disuelto en HCl 0,02 M y llevado a 1L con agua destilada. A cada frasco de fermentación se le agregó 38 mL de esta solución basal.

b) Solución de bicarbonato: 82g de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> se agregaron a 1L de agua destilada hervida. Antes de ser utilizada la solución debió ser gaseada con CO<sub>2</sub> durante 20 minutos. Cada frasco de fermentación contuvo 2 mL de solución de bicarbonato.

c) Agente reductor: 20,5g de Na<sub>2</sub>S·9H<sub>2</sub>O se disolvieron en 1 L de agua destilada hervida, con posterior gaseado con CO<sub>2</sub>. Cada frasco de fermentación tuvo 0,5 mL de este agente reductor.

Se eliminó el aire del interior de los frascos mediante una corriente de CO<sub>2</sub> e inmediatamente se sellaron con tapones de goma. Los frascos sellados con el sustrato y el medio permanecieron a 4°C por una noche para que se hidrate con el medio de incubación. Media hora antes de la inyección del inóculo (líquido ruminal fresco) los frascos fueron colocados en un baño María a 39°C en el que permanecieron hasta el final del periodo de incubación, y a dos frascos por tratamiento solo se les agregó el medio de incubación y líquido ruminal, ya que fueron los blancos de fermentación.

La presión de gas producido fue registrado a las 2, 4, 6, 8, 10, 12, 18, 24, 48, 72 y 96 h de la inoculación. Los valores de presión fueron convertidos a volumen usando la ecuación volumen de gas (ml) = 4,40 x P + 0,09 x P<sup>2</sup>, siendo P la presión registrada en psi. de un experimento previo en similares condiciones.

#### 7.4. DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS ALIMENTOS

Las muestras de alimentos se secaron en estufa durante 48 h a 60°C para determinar Materia Seca (MS) y luego se molieron en un molino de rotor provisto de criba de 1 mm (Fritsch GMBH, Idar-Oberstein, Alemania). Se determinaron Cenizas y Proteína Bruta según los métodos 942.05 y 984.13 respectivamente de AOAC (1990). La Materia Orgánica (MO) se calculó por diferencia (% MO = 100 - % de Cenizas). Las determinaciones de FDN y Fibra Detergente Ácida (FDA) se realizaron de acuerdo al método propuesto por Robertson y Van Soest (1981) usando un analizador de fibra ANKOM220 (ANKOM Technology Corp., Macedon, NY, USA), con  $\alpha$ -amilasa termoestable, y expresadas con la ceniza residual incluida.

#### 7.5. CÁLCULOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos de producción de gas *in vitro* se ajustaron por regresión no lineal al modelo exponencial simple con tiempo de latencia (Ørskov y McDonald, 1979):

$$y = a (1 - e^{-kdt-L})$$

Donde “y” es la producción acumulada de gas a tiempo t, “a” es la producción potencial de gas (ml/gMSi), “Kd” es la tasa fraccional de producción de gas (h<sup>-1</sup>) y “L” es el tiempo de latencia en la producción de gas (h).

Los diferentes parámetros de la producción de gas de cada sustrato fueron comparados para los distintos inóculos (tratamientos) mediante análisis de varianza y las medias separadas mediante el test de Tukey, considerando un nivel de significancia de P = 0,05.

## 8. RESULTADOS

En el cuadro IV se presentan los resultados de los parámetros de producción de gas *in vitro* de los distintos sustratos según el inóculo utilizado para la incubación.



**Cuadro IV. Parámetros de producción de gas *in vitro* de sustratos incubados con líquido ruminal de vacas alimentadas con RTM y forraje fresco.**

	RTM0			RTM4			RTM8			EEM	P > F		
	past	heno	paja	past	heno	paja	past	heno	paja		T <sup>1</sup>	S <sup>2</sup>	T x S <sup>3</sup>
<b>a</b>	182,2 <sup>a</sup>	168,0 <sup>b</sup>	120,0 <sup>d</sup>	182,7 <sup>a</sup>	166,1 <sup>b</sup>	130,7 <sup>c</sup>	173,9 <sup>ab</sup>	167,1 <sup>b</sup>	132,3 <sup>c</sup>	3,4	0,324	<0,0001	0,002
<b>kd</b>	0,103	0,080	0,037	0,097	0,079	0,035	0,103	0,079	0,035	0,005	0,100	<0,0001	0,390
<b>L</b>	1,16	1,06	2,19	1,27	1,34	1,98	1,09	0,91	1,81	0,31	0,014	<0,0001	0,226

<sup>1</sup>Efecto del tratamiento (inóculo)

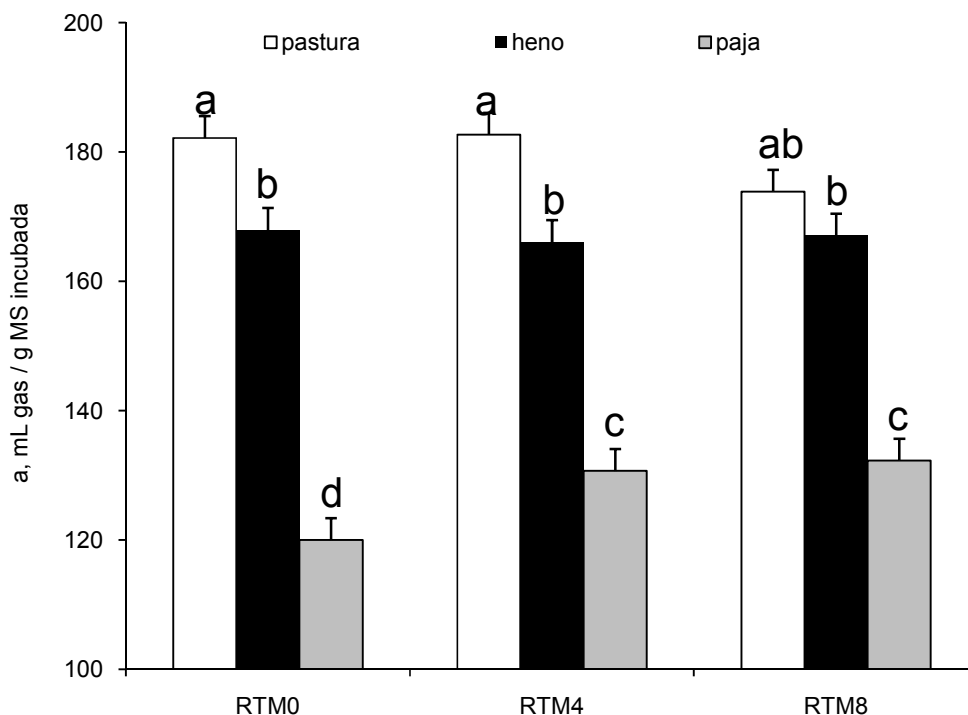
<sup>2</sup>Efecto del sustrato

<sup>3</sup>Efecto del tratamiento por el sustrato

past: pastura de alfalfa; heno: heno de alfalfa; paja: paja de trigo.

a: Producción potencial de gas (ml de gas/ g MS incubada); kd: tasa de producción de gas (h<sup>-1</sup>); L: tiempo de retardo en la producción de gas (h). RTM0: RTM *ad libitum* por 24 horas; RTM4: acceso a pastura por 4 horas *ad libitum* más RTM *ad libitum* por 20 horas; RTM8: acceso a pastura por 8 horas *ad libitum* más RTM *ad libitum* por 16 horas. EEM: error estándar de la media

La producción de gas fue similar entre los diferentes inóculos utilizados, pero presentó una interacción entre sustrato e inóculo, lo que indica que la producción de gas entre sustratos fue diferente dependiendo del origen del inóculo utilizado en la incubación. Con respecto a esto, el volumen de gas producido por la paja fue menor cuando el inóculo provino de animales que no recibían forraje fresco, mientras que para la pastura y el heno de alfalfa no hubo diferencias significativas entre inóculos (Figura II).



**Figura II.** Producción potencial de gas (variable “a”) a partir de pastura o heno de alfalfa, o paja de trigo, cuando son incubados con líquido ruminal proveniente de vacas alimentadas solo con ración totalmente mezclada (RTM0), o con 4 (RTM4) u 8 (RTM8) horas de acceso a un forraje fresco (raigrás anual).

Para la misma variable, y desde otro punto de vista, la pastura de alfalfa tuvo una mayor producción potencial de gas que el heno y la paja al ser incubada en el inóculo RTM0 y RTM4 ( $P < 0,05$ ), pero en el tratamiento RTM8 no se observó diferencia significativa entre la producción de gas de los sustratos de pastura y heno de alfalfa. A su vez, el heno de alfalfa produjo mayor volumen de gas que la paja de trigo en todos los inóculos ( $P < 0,05$ ).

La tasa fraccional de producción de gas de los sustratos utilizados no mostró diferencias significativas al ser incubadas en los distintos inóculos ( $P > 0,10$ ). Dicha

variable fue mayor para la pastura respecto al heno de alfalfa, y a su vez fue mayor en éste respecto a paja de trigo (0,101, 0,079 y 0,036%/h, respectivamente), independientemente del inóculo usado. No se detectó interacción entre inóculo y sustrato para esta variable.

El tiempo de latencia de los sustratos usados fue, en promedio, mayor en RTM4, en comparación con RTM0 y RTM8, que no mostraron diferencias significativas entre sí. Con respecto a los sustratos, el tiempo de latencia en el comienzo de producción de gas no fue distinto para pastura y heno de alfalfa, y en ambos fue mayor que la paja de trigo (1,2, 1,1 y 2,0 h, respectivamente). No se detectó interacción entre inóculo y sustrato para esta variable.

## 9. DISCUSIÓN

### 9.1. PRODUCCIÓN POTENCIAL DE GAS

La producción potencial de gas no se vio afectada por el tratamiento. Nuestros resultados no coinciden con Vibart y col. (2010), quienes evaluaron la fermentación ruminal *in vitro* incubando mezclas de RTM y pastura de alta calidad en distinta proporción (100% RTM, 85% y 15% pastura, 70% RTM y 30% pastura, 55% RTM y 45% pastura) en líquido ruminal de una vaca que consumía principalmente alfalfa y pasto ovillo. Estos autores observaron una mayor producción de gas a partir de las mezclas que tenían mayor proporción de pastura, y la menor cuando la dieta era 100% TMR. Los autores sugirieron que el líquido ruminal proveniente de un animal que consumía una dieta con mayores proporciones de celulosa proporcionaría un mejor ambiente para la degradación del sustrato con mayor cantidad de pastura y no para los que tenían mayor proporción de concentrados.

Sin embargo, el resultado obtenido coincide con el trabajo realizado por Santana (2012) con vaquillonas que consumieron 3 dietas diferentes (24 horas de RTM, 24 horas de pastura templada, o 18 horas RTM más 6 horas de pastura). El autor evaluó la producción de gas *in vitro* a las 12 horas incubando líquido ruminal obtenido de los animales de los distintos tratamientos con 3 sustratos diferentes (heno de gramíneas, pastura de raigrás, trébol blanco y trébol rojo, o pastura de alfalfa), y no observó diferencias entre tratamientos, asociado quizás a que tampoco se observaron modificaciones importantes en las principales características del ambiente ruminal, cuando fueron evaluadas *in vivo*.

Al analizar la interacción tratamiento por sustrato para la producción potencial de gas, no se encontraron diferencias significativas entre inóculos para cada sustrato, excepto para paja de trigo, donde la producción potencial de gas aumentó significativamente al pasar de RTM0 a RTM4. Este aumento de la variable “a” para la paja de trigo se puede atribuir a la mayor proporción de carbohidratos no fibrosos en la RTM respecto a la pastura (Duvos y col., 2013). Por ejemplo, una elevada ingesta de carbohidratos no fibrosos como el almidón, de rápida fermentación ruminal, podría aumentar la producción de AGV ruminal y disminuir el pH ruminal. Hiltner y Dehority (1983) consideran que el descenso del pH por debajo de un nivel crítico que algunos autores señalan que es 6,2, reduce la degradación del forraje ya que afecta el metabolismo de las bacterias celulíticas y por lo tanto su actividad fibrolítica. Por eso, sería esperable que la dieta RTM0, con mayor proporción de carbohidratos no fibrosos que las otras dietas experimentales, causara un ambiente ruminal menos favorable para la actividad de las bacterias que digieren fibra.

Las pajas en general son alimentos con una pared celular compleja, con un grado de lignificación importante, y que es más difícil de atacar por los microorganismos del rumen (Graham y Aman, 1991); en sentido inverso, el heno y la pastura de alfalfa tenían menor cantidad de pared celular y/o con menor grado de lignificación que la paja, y que probablemente sería menos difícil de degradar en comparación con la

pared celular de la paja de trigo. Por lo tanto, aún en un ambiente ruminal menos favorable, las bacterias celulolíticas habrían sido capaces de degradar más extensamente el heno y la pastura de alfalfa. Esto estaría apoyado por lo observado por Vibart y col. (2010), quienes dijeron que cuando el inóculo se obtuvo de animales comiendo una dieta celulolítica, los sustratos fibrosos se digirieron mejor.

Sin embargo, hay que decir que en este trabajo el pH ruminal al momento de tomar la muestra de líquido ruminal nunca estuvo por debajo de 6,2 (Mendoza y col., 2012), valor considerado como crítico para la digestión de la fibra por Hiltner y Dehority (1983). Con todo, hay que destacar que según Mould y col. (1984) y Piwonka y Firkins, (1993), el solo aporte neto de carbohidratos de fácil fermentación por sí mismo puede afectar la degradación de la pared celular, aún cuando el pH ruminal sea óptimo.

## 9.2. TASA FRACCIONAL DE PRODUCCIÓN DE GAS

Se observó que no hubo variación entre tratamientos respecto a la tasa fraccional de producción de gas. Esto coincide con lo observado para la variable "a", donde tampoco se observó un efecto del tratamiento sobre dicha variable. Si bien podría ser esperable que una dieta que incluya mayor proporción de concentrados tuviera un efecto negativo sobre la actividad microbiana, lo que se hubiera reflejado en una menor tasa de producción de gas, ello no ocurrió. La explicación más lógica es que, según lo reportado por Duvos y col. (2013), la proporción de forraje fresco en la dieta de las vacas no superó en promedio el 20% del total de materia seca ingerida (en RTM8). Si bien la ingesta de carbohidratos no fibrosos fue mayor a mayor proporción de RTM en la dieta, no habría sido de tal magnitud como para haber afectado la actividad microbiana de una manera que se viera reflejada en la tasa de producción de gas.

La tasa de producción de gas a partir de los diferentes sustratos siguió la misma tendencia, independientemente del inóculo en el cual se hubieran incubado. La mayor tasa de producción de gas a partir de la pastura, seguida del heno y por último la paja, puede deberse al creciente grado de lignificación de la pared celular vegetal de cada uno de estos sustratos (NRC, 2001). Esto se debe a que se considera que el contenido de lignina es el principal impedimento en la digestibilidad del forraje, estando correlacionado negativamente con dicha variable (Jung y col., 1997).

Otros autores también señalan que la degradación en el rumen de los hidratos de carbono de las paredes celulares es más lenta y menos extensa a mayor grado de lignificación de la misma (Van Soest, 1994). Por otra parte, la pastura de alfalfa al tener mayor cantidad de carbohidratos de fácil digestión que el heno, y éste que la paja, hace que la velocidad de la producción de gas sea mayor. Respecto a que la variable Kd no tuvo diferencias significativas entre los diferentes tratamientos; esto concuerda con Vibart y col. (2010).

## 9.3. TIEMPO DE RETARDO

El tiempo de retardo en la producción de gas (L) indica cuánto tiempo se demoró en comenzar a producir gas, y esto depende de la velocidad con la que los

microorganismos colonizan y comienzan a degradar sustrato. Los resultados sugieren que la microbiota del rumen tuvo más dificultades en comenzar a fermentar cuando las vacas recibieron la dieta RTM4 en comparación a RTM8, pero no hubo diferencias entre RTM4 y RTM0. Esto podría explicarse por el retardo en la adhesión microbiana asociado al menor pH observado justamente en el tratamiento RTM4 respecto al RTM8 (Mendoza y col., 2012). En este sentido, según Sung y col. (2007), el pH ruminal es uno de los determinantes más importantes de la digestión de la fibra, que es modulada a través del efecto sobre la unión bacteriana a sustratos de fibra; un pH bajo puede causar la lisis o bien el desprendimiento de las células bacterianas de la fibra no digerida. Asimismo, otros autores también han reportado que la reducción del pH desde 7 a 5,5 puede causar una disminución lineal en el tiempo de retardo y/o la tasa de degradación de la fibra (Kozloski y col., 2008).

## **10. CONCLUSIONES**

Se concluye que, a excepción del tiempo de retardo, que fue mayor en RTM4 en comparación con RTM8, el tiempo de acceso a un forraje fresco de alta calidad en vacas alimentadas con una RTM no tuvo efectos marcados sobre los demás parámetros de producción de gas *in vitro*.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

1. AOAC. (1990) Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of analysis. 15th ed. Arlington, VA, EEUU.
2. Bargo, F., Muller, L.D., Delahoy, J.E., Cassidy, T.W. (2002a) Performance of high producing dairy cows with three different feeding systems combining pasture and total mixed rations. *J. Dairy Sci.* 85: 2948–2963.
3. Bargo, F., Muller, L.D., Varga, G.A., Delahoy, J.E., Cassidy, T.W. (2002b) Ruminant digestion and fermentation of high-producing dairy cows with three different feeding systems combining pasture and total mixed rations. *J. Dairy Sci.* 85: 2964–2973.
4. Bargo, F., Muller, L.D., Kolver, E.F., Delahoy, J.E. (2002c) Invited review: Production and digestion of supplemented dairy cows on pasture. *J. Dairy Sci.* 86: 1–42.
5. Bruni, M. A., Chilibroste, P. (2001) Simulación de la digestión ruminal por el método de la producción de gas. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal*. Vol. 9 (1). pp: 43-51.
6. 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.
7. 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. pp: 265-266.
8. Cheng, K.H., Akin, D.E., and Costerton, J.W. Rumen bacteria: Interaction with particulate dietary components and response to dietary variation. *Fed. Proc.* 1977; 36: 193–203.
9. Church D.C. (1993). El rumiante: fisiología digestiva y nutrición. Zaragoza, Ed. Acribia, 641p.
10. Coppock CE, Bath DL, Harris B. (1981) From feeding to feeding systems. *J. Dairy Sci.* 64: 1230-1249.
11. Dehority, B. A. (1987) Rumen microbiology. Wooster: ohio state university, 239p.
12. Durán H. (2004) Cambios tecnológicos e intensificación en los sistemas pastoriles de producción de leche en Uruguay. INIA. Serie de Actividades de Difusión N° 361. pp: 115-122.
13. Duvos, M., Iriarte, A., Machiavello, N. (2013) Consumo de nutrientes, y perfil metabólico y hormonal en vacas lecheras consumiendo una ración totalmente



mezclada con distintas horas de acceso a una pastura templada. Tesis de grado. Facultad de Veterinaria, Universidad de la República. Uruguay. 32 p.

14. Eastridge, M.L. (2006) Major advances in applied dairy cattle nutrition. J. Dairy Sci. 89: 1311-1323.
15. France, J., Dijkstra, J., Dhanoa, M.S., López, S., Bannink, A., 2000. Estimating the extent of degradation of ruminant feeds from a description of their gas production profiles observed *in vitro*: derivation of models and other mathematical considerations. Br. J. Nutr. 83, 143–150.
16. Graham, H., Aman, P. (1991) Nutritional aspects of dietary fibres. Anim. Feed Sci. Technol. 32: 143-158.
17. Hall M.B., Huntington G.B. 2008. Nutrient synchrony. Sound in theory, elusive in practice. J. Anim. Sci. 86 (E. Suppl.): E287-E292.
18. Hiltner, P., Dehority, B.A. (1983) Effect of soluble carbohydrates on digestion of cellulose by pure cultures of rumen bacteria. Environ. Microbiol. 56: 1221-1228.
19. Hobson, P.N.; Stewart, C.S. The rumen microbial ecosystem. 2.ed. London: Blackie Academic and Professional. 1997, 719p.
20. Jung, H.G., Mertens, D.R., Payne, A.J. (1997) Correlation of acid detergent lignin and Klason lignin with digestibility of forage dry matter and neutral detergent fiber. J. Dairy Sci. 80:1622–1628.
21. Kamra, D.N. (2005) Rumen microbial ecosystem. Curr. Sci. 89:124-135.
22. Kolver, E.S., Muller, L.D. (1998) Performance and nutrient intake of high producing Holstein cows consuming pasture or a total mixed ration. J. Dairy Sci. 81:1403-1411.
23. Kozloski, G. V. (2002). Bioquímica dos ruminantes. Santa Maria: UFSM.
24. Kozloski, G.V., Lima, L.D., Cadorin Jr., R.L., Bonnacarrere Sanchez, L.M., Senger, C.C.D., Fiorentini, G., Harter, C.J. (2008) Microbial colonization and degradation of forage samples incubated *in vitro* at different initial pH. Anim. Feed Sci. Technol. 141: 356–367.
25. Lammers, B.P., Heinrichs, A., Ishler, V.A. (2002) Uso de ración totalmente mezclada (TMR) para vacas lecheras. Departamento de Ciencias Animales, Universidad Estatal de Pennsylvania. Disponible en: [www.das.psu.edu/teamdairy](http://www.das.psu.edu/teamdairy) Fecha de consulta: 24/10/11.
26. Liu, J.X., Susenbeth, A., Sudekum, K.H. (2002) In vitro gas production measurements to evaluate interactions between untreated and chemically treated rice straws, grass hay, and mulberry leaves. J. Anim. Sci. 80: 517-524.

27. López, S., Dhanoa, M.S., Dijkstra, J., Bannink, A., Kebreab, E., France, J. (2007) Some methodological and analytical considerations regarding application of the gas production technique *Anim. FeedSci. Technol.* 135: 139–156.
28. Mackie R.I., White B.A. (1990). Recent advances in rumen microbial ecology and metabolism: potential impact on nutrient output. *J Dairy Sci* 73:2971-2995.
29. Mauricio, R.M., Mould, F.L., Dhanoa, M.S., Owen, E., Channa K.S., Theodorou, M.K. (1999) A semi-automated in vitro gas production technique for ruminant feedstuff evaluation. *Anim. Feed Sci. Technol.* 79: 321-330.
30. McDonald, P., Edwards, R.A., Greenhalgh, J.F.D., Morgan, C.A. (2006) *Nutrición Animal*, 6ª.ed. Zaragoza. Acribia. 587 p.
31. Mendoza, A., Cajarville, C., Santana, A., Repetto, J.L. (2011) ¿Hacia una nueva forma de pensar la alimentación de las vacas lecheras? La inserción del confinamiento en los sistemas pastoriles de producción de leche. XXXIX Jornadas Uruguayas de Buiatría. Paysandú, Uruguay. pp: 82-90.
32. Mendoza A, Cajarville C, Amaral V, Pirotto E, Puig M, Repetto JL. (2012). Concentración de nitrógeno amoniacal y pH ruminal en vacas lecheras alimentadas con forraje fresco y ración totalmente mezclada. *Veterinaria (Montevideo)* 48 (Supl. 1): 150.
33. Miron J., Ben-Ghedalia D., y Morrison M. (2001). Adhesion mechanisms of rumen cellulolytic bacteria. *J. Dairy Sc.* 84: 1294-1309.
34. Morales, A., Soldado, A., González, A., Martínez, A., Domínguez, I., de la Roza, B., Vicente, F. (2010) Improving the fatty acid profile of dairy cow milk by combining grazing with feeding of total mixed ration. *J. Dairy Res.* 77: 225-230.
35. Mould, F.L., Ørskov E.R., Mann S.O. (1984) Associative effects of mixed feeds I. Effects of type and level of supplementation and the influence of the rumen fluid pH on cellulolysis in vivo and dry matter digestion of various roughages. *Anim. Feed Sci. Technol.* 10:15-30.
36. Nagadi, S., Herrero, M., Jessop, N.S. (200) The influence of diet of donor animal on the initial bacterial concentration of ruminal fluid and in vitro gas production degradability parameters. *Anim. Feed Sci. Technol.* 87: 231-239.
37. Noguera, R.R., Saliba, E.O., Mauricio, R.M. (2004) Comparación de modelos matemáticos para estimar los parámetros de degradación obtenidos a través de la técnica de producción de gas. *Livest. Res. Rur. Dev.* 16 (11) Disponible en: <http://www.cipav.org.co/lrrd/lrrd16/11/nogu16086.htm>. Fecha de consulta: 17 de noviembre de 2013.

38. NRC. National Research Council. (2001) Nutrient requirements of dairy cattle. 7a. ed. Washington D.C., National Academy Press. 381 p.
39. Ørskov ER, McDonald I. (1979) The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rates of passage. J. Agric. Sci. (Cambridge) 92: 499–503.
40. Owens, F.N., Goetsch, A.L. (1988) Fermentación ruminal. En: Church, C.D. El Rumiante, fisiología digestiva y nutrición. Acribia. Zaragoza. pp: 159-189.
41. Piwonka, E.J., Firkins, J.L. (1993) Effect of glucose on fiber digestion and particle-associated carboxymethyl-cellulase activity in vitro. J. Dairy Sci. 76: 129-139.
42. Posada, S.L., Noguera, R.N. (2007) Comparación de modelos matemáticos: una aplicación en la evaluación de alimentos para animales. Rev. Col. Cienc. Pec. 20:141-148.
43. Repetto, J.L., Cajarville, C. (2009). ¿Es posible lograr la sincronización de nutrientes en sistemas pastoriles intensivos? XXXVII Jornadas Uruguayas de Buiatría. Paysandú, Uruguay. pp: 60-67.
44. Robertson J.B., Van Soest P.J. (1981). The detergent system of analysis. En: James, W.P.T., Theander, O. (Eds.), The Analysis of Dietary Fibre in Food. Marcel Dekker, New York, pp. 123-158.
45. Rushen, J., de Passille, A.M., von Keyserlingk, M.A.G., Weary, D.M. (2008). Housing for adult cattle. En: The welfare of cattle (Eds: J. Rushen, J., A.M. de Passillé, A.M, M.A.G. von Keyserlingk, D.M. Weary. Springer. Amsterdam, Netherlands. pp 142-180.
46. Rymer C., Huntington J.A., Williams B.A., Givens D.I. (2005) *In vitro* cumulative gas production techniques: History, methodological considerations and challenges. Anim. Feed Sci. Technol. 123-124: 9-30.
47. Santana A. (2012) Inclusión de pastura templada en una dieta completamente mezclada en vaquillonas: Efectos sobre el consumo, el aprovechamiento digestivo y metabólico de los nutrientes. Tesis de Maestría en Nutrición de Rumiantes. Facultad de Veterinaria. Universidad de la República. Uruguay. 45 p.
48. Schingoethe D.J. 1996. Balancing the amino acids needs of dairy cows. Anim. Feed Sci. Technol. 60: 153-160.
49. Silva de Oliveira, J.S., Zanine A.M., Santos E.M. (2007) Processo fermentativo, digestivo e fatores antinutricionais de nutrientes para ruminantes. Revista electrónica de Veterinaria 1695-7504. Vol. VIII N. 2.

50. Soder, K.J., Brito, A.F., Rubano, M.D. (2013) Effect of supplementing orchard grass herbage with a total mixed ration or flaxseed on fermentation profile and bacterial protein synthesis in continuous culture. *J. Dairy Sci.* 96: 3228-3237.
51. Sung, H.G., Kobayashi, Y., Chang, J., Ha, A., Hwang, I.H., Ha, J.K. (2007) Low ruminal pH reduces dietary fiber digestion via reduced microbial attachment. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 20: 200 – 207.
52. Theodorou M.K., Williams B.A., Dhanoa M.S., Mc Allan A.B., France J. (1994) A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Anim. Feed Sci. Technol.* 48: 185-197.
53. Tomich, T.R., Goncalves, L.C., Mauricio, R.M. (2003) Bromatological composition and rumen fermentation kinetics of hybrids from crosses of sorghum and sudan grass. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.* 55: 747-755.
54. Valkeners, D., A. Théwin, F. Piron and Y. Beckers. (2006). Effect of various levels of imbalance between energy and nitrogen release in the rumen on microbial protein synthesis and nitrogen metabolism in growing double-muscled Belgian Blue bulls fed a corn silage-based diet. *Journal of Animal Science* 84:877-885.
55. Van Soest, P.J. (1994) *Nutritional Ecology of the Ruminant*. 2a Ed. Cornell University Press. 476 p.
56. Vibart, R.E., Fellner, V., Burns, J.C., Huntington, G.B., Green, J.T. (2008) Performance of lactating dairy cows fed varying levels of total mixed ration and pasture. *J. Dairy Sci.* 75: 471–480.
57. Vibart R.E., Burns J.C., Fellner V. (2010) Effect of replacing total mixed ration with pasture on ruminal fermentation. *Prof. Anim. Sci.* 26: 435–442.
58. Williams, B.A., Bosch, M.W., Boer, H., Verstegen, M.W.A., Tamminga, S. (2005) An in vitro batch culture method to assess potential fermentability of feed ingredients for monogastric diets. *Anim. Feed Sci. Technol.* 123-124: 445-462.
59. Williams B.A. (2000) Cumulative gas-production techniques for forage evaluation. En: Givens D I; Owen E., Omed H. M. Axford R. F. E. (ed). *Forage Evaluation in Ruminant Nutrition*. Wallingford. CAB International. pp: 189-213.