



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

**COMBINACIÓN DE DIFERENTES NIVELES DE FORRAJE FRESCO Y RACIÓN
TOTALMENTE MEZCLADA EN DIETAS DE VACAS LECHERAS: EFECTO
SOBRE EL AMBIENTE RUMINAL**

Por

**Matías BURUTARAN FRANZONI
Irina FORNIO PÉREZ**

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
2015**

PÁGINA DE APROBACIÓN

TESIS aprobada por:

Presidente de Mesa:

Segundo Miembro (Tutor):

DCV.MSc. Nicolle Pomiés

Tercer Miembro:

Cuarto miembro (Co-tutor)

DMTV. PhD. Cecilia Cajarville

Quinto miembro (Co-tutor)

DMTV.Maximiliano Pastorini

Fecha:

Autores:

Br. Matías BURUTARAN FRANZONI

Br. Irina FORNIO PEREZ

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Nicolle Pomiés, nuestra tutora, por su paciencia y dedicación.
Al Dr. Maximiliano Pastorini y la Dra. Cecilia Cajarville, por su ayuda y apoyo.
A los compañeros tesisistas por las largas horas compartidas de trabajo.
A nuestros amigos de Facultad.
A los funcionarios del Campo Experimental N°2 Libertad.
A los funcionarios de la biblioteca de la Facultad de Veterinaria.
A nuestras familias y amigos que nos brindaron el apoyo incondicional en estos años de estudiantes.
Y por último agradecer a nuestros padres por enseñarnos la dedicación y la perseverancia.

A todos ellos.... Gracias.

LISTA DE ABREVIATURAS

AGV: ácidos grasos volátiles
ENL: energía neta lactación
FAD: fibra ácido detergente
FF: forraje fresco
FND: fibra neutro detergente
MO: materia orgánica
m.o.: microorganismos
MS: materia seca
N-NH₃: nitrógeno amoniacal
N: nitrógeno
P: probabilidad
PB: proteína bruta
RTM: ración totalmente mezclada
NNP: nitrógeno no proteico
CO₂: dióxido de carbono
NH₄: amonio
CHO: carbohidratos
PM: proteína microbiana
CNF: carbohidratos no fibrosos
EE: extracto al éter
AS: azúcares solubles
NDIN: nitrógeno insoluble en detergente neutro
NIDA: nitrógeno insoluble en detergente ácido

TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
LISTA DE ABREVIATURAS.....	IV
TABLA DE CONTENIDO.....	V
LISTA DE CUADROS Y FIGURAS.....	VI
1. RESUMEN.....	1
2. SUMMARY.....	2
3. INTRODUCCIÓN.....	3
4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	4
4.1. DIGESTION RUMINAL.....	4
4.2. PASTURAS DE ALTA CALIDAD.....	7
4.3. RACIONES TOTALMENTE MEZCLADAS Y RACIONES PARCIALMENTE MEZCLADAS.....	8
5. HIPOTESIS.....	11
6. OBJETIVOS.....	12
6.1. OBJETIVO GENERAL.....	12
6.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	12
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
7.1. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	13
7.2. MANEJO DE LOS ANIMALES Y ALIMENTACION.....	13
7.3. MEDICIONES Y CALCULOS.....	16
7.3.1 AGV, N-NH ₃ Y pH ruminal.....	16
7.3.2. Composición química de alimentos.....	16
7.3.3. Análisis estadístico.....	16
8. RESULTADOS.....	18
9. DISCUSION.....	22
10. CONCLUSIONES.....	25
11. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	26

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

Página

Cuadro I. Composición química de la pastura (<i>Lolium multiflorum</i>), la RTM y los alimentos utilizados para formular la RTM	14
Cuadro II. Ingredientes de la ración totalmente mezclada (RTM).....	15
Cuadro III. Valores promedio de pH, de concentración de N-NH ₃ (mg/dL) ruminal, de concentración total de AGV (mmol/L) y diferentes proporciones de AGV en rumen en vacas alimentadas con diferentes proporciones de RTM y FF (RTM100, RTM75, RTM50).....	18
Figura 1. Esquema de determinaciones experimentales.....	15
Figura 2. Dinámica de pH y de N-NH ₃ (mg/dL) ruminal en vacas alimentadas con forraje alimentadas con diferentes proporciones de RTM y FF (RTM 100, RTM 75, RTM 50 respectivamente, media ± error estándar de la media).....	19
Figura 3. Dinámica de concentración total de AGV (mmol/L), proporción molar de acético, propiónico, butírico (%), relación A+B/P, y relación A/P en rumen de vacas alimentadas con forraje alimentadas con diferentes proporciones de RTM y FF (RTM100, RTM75, RTM50 respectivamente, media ± error estándar de la media).....	20

1. RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue evaluar el ambiente ruminal en vacas lecheras alimentadas con forraje fresco (FF) y ración totalmente mezclada (RTM). Se utilizaron 12 vacas multíparas Holando de 90 ± 22 días de lactancia, 523 ± 88 kg de peso vivo y 7908 ± 719 kg de leche de producción en la lactancia anterior. Los animales fueron agrupados en un diseño de cuadrado latino de 3×3 por cuadruplicado, bloqueados en función de su peso vivo, producción al inicio del experimento, y producción en la lactancia previa. Dentro de cada cuadrado se asignaron al azar 3 tratamientos: Tratamiento RTM100: oferta *ad libitum* de una RTM. Tratamiento RTM75: oferta equivalente al 75 % del consumo estimado de MS de la RTM utilizada en el Tratamiento 1 + oferta equivalente al 25% del consumo estimado de MS de FF; Tratamiento RTM50: oferta equivalente al 50 % del consumo estimado de MS de la RTM utilizada en el tratamiento 1 + oferta equivalente al 50% del consumo estimado de FF. El experimento tuvo una duración total de 66 días, divididos en 3 períodos de 22 días cada uno, donde los primeros 11 días fueron de adaptación y los 11 días siguientes de mediciones. En el periodo de mediciones se colectó durante el día 9 de cada período, a cada hora y durante 12 horas consecutivas muestras de líquido ruminal de 6 vacas fistulizadas en el rumen para determinar las siguientes variables: pH, concentración de amoníaco (N-NH₃) y concentración de ácidos grasos volátiles (AGV). Los datos fueron analizados como medidas repetidas en el tiempo. La media diaria del pH ruminal no fue afectado por los tratamientos ($6,06 \pm 0,04$) pero se detectó interacción tratamiento x hora y efecto hora ($P < 0,001$). El pH presentó su máximo valor (6,26) a la hora 1 luego de iniciada la sesión de alimentación. El valor mínimo fue 5,77 a la hora 12. La concentración media de N-NH₃ en rumen fue menor para el tratamiento RTM 50 con respecto a RTM 75 y RTM 100 ($P < 0,01$) siendo afectada por la hora ($P < 0,001$) pero no presentó interacción tratamiento x hora. La concentración total de AGV (mmol/L) no fueron estadísticamente diferentes entre los tres tratamientos ($117,8 \pm 8,78$), tampoco se encontraron diferencias en la proporción de ácido acético pero sí para la proporción de ácido propiónico ($P < 0,001$) la cuál fue mayor en el tratamiento RTM100 ($32,4 \pm 1,44\%$) respecto a RTM75 ($28,6 \pm 1,44\%$) y RTM50 ($27,2 \pm 1,44\%$). Por otra parte, la proporción de ácido butírico fue mayor en el tratamiento RTM50 ($13,9 \pm 1,61\%$) y RTM75 ($13,3 \pm 1,61\%$) respecto de RTM100 ($10,9 \pm 1,61\%$) ($P < 0,001$). Se concluye que modificar las proporciones de FF y RTM sobre el ambiente ruminal produjeron efectos moderados sobre la fermentación ruminal de vacas lecheras.

2. SUMMARY

The aim of this study was to evaluate the rumen environment in dairy cows fed with FF and TMR. We used 12 multiparous Holstein cows of 90 ± 22 days of lactation, 523 ± 88 kg of live weight and 7908 ± 719 kg milk production in the previous lactation. Animals were grouped together in a latin square design of 3x3 by quadruplicate, blocked based on their body weight, production at the beginning of the experiment and production in previous lactation. Within each square treatments were randomly assigned: TMR100 treatment: TMR *ad libitum* offer. TMR75 treatment: offer equivalent 75 % of the estimated dry matter intake of TMR used in treatment 1 + offer to equivalent 25% of estimated dry matter intake of FF; TMR50 treatment: equivalent offer to the 50% of the estimated dry matter intake of the TMR used at treatment 1 + equivalent offer to the 50 % of the FF estimated dry matter intake. The experiment took a total of 66 days, divided into three periods of 22 days each, where the first 11 days were for adaptation and the following 11 days for measurements. On day 9 of measurements period of each we collected ruminal fluid from 6 fistulated cows every hour for 12 consecutive hours, in order to determinate the following variables: pH, ammonia concentration (N - NH₃) and concentration of volatile fatty acids (VFA) . All the data was analyzed as a repeated measure through time. The pH was not affected by treatments (6.06 ± 0.04) but there was interaction between treatment per hour as well as hour effect ($P < 0.001$). pH presented its maximum value (6.26) at the first hour of starting the feeding. The minimum value was 5.77 at hour 12. N-NH₃ average concentration in rumen was lower for treatment RTM 50 comparing to RTM 75 and RTM 100 ($P < 0.01$) being affected by time ($P < 0.001$) but did not show treatment per hour interaction. VFA total concentration (mmol / L) did not differ among the three treatments (117.8 ± 8.78), also no differences in the proportion of acetic acid were found but there was for the proportion of propionic acid ($P < 0.001$) which was higher in treatment RTM100 ($32.4 \pm 1.44\%$) compared to RTM75 ($28.6 \pm 1.44\%$) and RTM50 ($27.2 \pm 1.44\%$). On the other hand, the proportion of butyric acid was higher in the RTM50 ($13.9 \pm 1.61\%$) and RTM75 treatment ($13.3 \pm 1.61\%$) for RTM100 ($10.9 \pm 1.61\%$) ($P < 0.001$). We can conclude that a change in the proportion of FF and RTM on the rumen environment caused moderate effects on rumen fermentation of dairy cows.

3. INTRODUCCION

En Uruguay los sistemas de producción de leche han tenido un crecimiento constante y sostenido en los últimos años, lográndose un record en producción de leche comercial en 2014 (DIEA 2014). Este aumento en la producción se da por la intensificación de los sistemas lecheros ya que la superficie explotada ha disminuido (DIEA 2014). Esto lleva a que la alimentación de los animales se vea modificada, ya que es necesario la utilización de concentrados en la dieta para satisfacer las demandas energéticas y proteicas que se requieren para lograr el máximo de producción. En Uruguay la base de alimentación en los tambos es fundamentalmente pastoril. Esto es debido a que gran parte del país posee condiciones muy favorables para la producción de forrajes de alta calidad (Repetto y Cajarville, 2009). En producciones semi-intensivas como la lechería, las pasturas de alta calidad representan alrededor del 50% de la dieta. Esto se debe no solo a la relación costo/beneficio sino también la contribución al medio ambiente, el bienestar animal y a las propiedades nutraceuticas del producto final (Chaudry, 2008). Es importante considerar que los sistemas pastoriles pueden tener beneficios sobre la salud de los animales, respecto a los sistemas de confinamiento, ya que se considera que promueven un mayor bienestar a los mismos (Rushen y col., 2008).

Los sistemas de producción de leche en la región y en Uruguay presentan un desbalance entre oferta y demanda de nutrientes. Este desbalance se intenta corregir con suplementación de reservas forrajeras y concentrados, derivando en sistemas con niveles crecientes de complejidad operativa, requerimientos de infraestructura y fundamentalmente de precisión en el manejo de los recursos alimenticios (Chilibroste y col., 2012). Esto ha llevado a que los sistemas lecheros utilicen dietas mixtas que combinan el pastoreo directo con el uso de concentrados y/o forrajes conservados en diferentes proporciones y suministrados separadamente o en forma de RTM (ración totalmente mezclada). Los sistemas de alimentación que utilizan RTM ofrecen la posibilidad de suministrar los alimentos en forma conjunta aportando un adecuado balance de nutrientes si ésta es formulada con precisión (Bargo y col., 2002). Estas diferencias en los sistemas de alimentación lleva a que se generen variaciones en el ambiente ruminal de los animales y en el desempeño productivo de los mismos. Los animales que son alimentados exclusivamente en base a pasturas van a tener un menor consumo de materia seca total, y por lo tanto de nutrientes si los comparamos con los animales que consumen una RTM, lo cual lleva a que el potencial lechero no se exprese completamente (Kolver, 2003). Cuando los rumiantes consumen pasturas templadas de alta calidad, están ingiriendo grandes cantidades de nitrógeno debido a que la proteína aportada por esta pastura es altamente soluble y de muy rápida degradación, dando como resultado altas concentraciones instantáneas de nitrógeno amoniacal (N-NH₃) a nivel ruminal (Repetto y Cajarville, 2009; Cajarville y Repetto, 2005). Debido al desbalance entre esta oferta de nutrientes y demanda, se aplican sistemas mixtos que combinen ambas alternativas, RTM + pasturas, conocidos como RPM (ración parcialmente mezclada), para así cubrir los requerimientos animales, aumentar la producción individual, y lograr mantener esa producción durante todo el año.

4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

4.1. DIGESTIÓN RUMINAL

La digestión en los rumiantes es el resultado neto de una secuencia de procesos que ocurren en diferentes segmentos del tracto gastrointestinal. Esta secuencia incluye: fermentación de los componentes de la dieta por los microorganismos en el retículo-rumen, la hidrólisis ácida y degradación enzimática en el abomaso e intestino, y la segunda fermentación en el ciego y en el intestino grueso (Merchen *et al.*, 1997). Previa a la fermentación microbiana el alimento sufre acción mecánica en la masticación cuando el animal ingiere los alimentos. Esta acción mecánica sirve para reducir el tamaño de las partículas pero no es suficiente para permitir la absorción de nutrientes. Cuando el alimento ingresa al aparato digestivo no está directamente disponible para ser utilizado por el animal. Previa a la digestión glandular el alimento sufre una transformación adicional en el retículo-rumen por acción de la rumia y de los m.o. presentes. El principal estimulante de la rumia es la propia estructura física del forraje, la cual depende del contenido de fibra de la dieta (Relling y Mattioli, 2002)

El retículo-rumen posee características que proporcionan un sistema de cultivo continuo para los m.o. Una de estas es la capacidad de mantener el pH regulado (6,4 – 6,8), esto resulta del equilibrio entre la producción de ácidos en la fermentación, la absorción de los mismos y el aporte de fosfatos y bicarbonatos proveniente de la saliva que actúan como tampones. Otra de las características del medio ruminal es tener una temperatura estable entre 38 y 42°C. Al mismo tiempo posee un gran contenido de humedad debido a la gran cantidad de agua libre proveniente del agua de bebida, salivación y alimentación. A su vez mantiene un ambiente de anaerobiosis como consecuencia del rápido consumo de oxígeno que ingresa al rumen (McDonald *et al.*, 2006). Un ambiente ruminal óptimo en su actividad celulítica, para la digestión de la fibra y para la síntesis de grasa butirosa es aquel que presenta valores de pH 6,7 y 6,8, una concentración de N-NH₃ (nitrógeno amoniacal de 5 mg% y de ácidos grasos volátiles (AGV) de 70-90 mmol/L; y una relación acético:propionico de 3 a 3,5:1 (Rearte y Santini, 1989)

La mayoría de los m.o que se encuentran en el retículo rumen son anaerobios estrictos, aunque existen algunos facultativos. Estos m.o son principalmente bacterias, protozoarios y hongos del tipo de las levaduras. Dentro de estos las bacterias se clasifican generalmente según el sustrato que utilizan o según los productos finales de la fermentación que realizan; de este modo tenemos bacterias celulolíticas, las cuales predominan en dietas con alto contenido en forraje, bacterias hemicelulolíticas y pectinolíticas. Las amilolíticas predominan en el rumen con el consumo de dietas con alto contenido de almidón. Las bacterias que utilizan ácidos intermedios realizan la fermentación secundaria de los productos finales a partir de otros m.o. Entre estos ácidos podemos encontrar el lactato, succinato y metano. El lactato puede ser fermentado hasta acetato, propionato o ácidos grasos de cadena más larga, el succinato es convertido en propionato y CO₂ y el metanoato es utilizado como precursor para la producción de metano (Van Lier y Regueiro, 2008).

A pesar de que la población bacteriana comparte el mismo hábitat, los distintos grupos que la componen requieren diferentes condiciones para alcanzar su desarrollo óptimo. Esto se refiere principalmente a las condiciones de pH, donde las bacterias amilolíticas son activas a un pH entre 5,5 y 6, en tanto que las bacterias celulolíticas son activas a un pH más alto entre 6 y 7. Por lo tanto una dieta rica en concentrado (almidón) requerirá para su fermentación de bacterias amilolíticas, en tanto una dieta rica en fibra (celulosa) necesitará de bacterias celulolíticas (Kaufmann y Saelzer, 1980)

Pasando a analizar las fracciones que constituyen la dieta de los rumiantes se hace referencia en primer lugar a los carbohidratos. La mayor parte de estos son fermentados en rumen generando AGV, principalmente acetato (C2) propionato (C3) y butirato (C4), N- amoniacal (N-NH₃), gases 2/3 dióxido de carbono (CO₂) y 1/3 metano (CH₄) (Church, 1993). Estos AGV constituyen la principal fuente de energía para los rumiantes, constituyendo entre el 50 y 70% de la energía digestible que se encuentra en el alimento. Cuando se da un consumo mayor de fibra se da una fermentación más acética, y dietas ricas en almidón generan una fermentación más propiónica (Relling y Mattioli, 2003).

En el contenido celular encontramos azúcares solubles y la pectina asociada a la membrana celular. Estos carbohidratos son de fácil digestión porque son de fácil acceso para los m.o. y su estructura es relativamente sencilla. El carbohidrato de almacenamiento, o azúcar de reserva de las plantas, es el almidón. Este también es considerado de fácil digestión una vez abierto el grano. La celulosa y la hemicelulosa son los carbohidratos estructurales de la planta. Constituyen las paredes celulares y corresponden a la fracción fibrosa del alimento. A estos compuestos se asocia la lignina (que no es un carbohidrato) y que dificulta la digestión de la fibra. Por este motivo y por la forma que toman las moléculas de celulosa y hemicelulosa, estos carbohidratos son considerados de difícil digestión. (Van Lier y Regueiro, 2008). Los polisacáridos no estructurales provienen principalmente de dietas ricas en concentrados, y fermentan de forma rápida y casi en su totalidad, ya que una fracción del almidón pasa al intestino en forma *by pass*. Un correcto equilibrio entre carbohidratos estructurales y no estructurales se considera importante en vacas lecheras para lograr una producción de leche eficiente (Van Lier y Regueiro, 2008).

Los AGV, producto final de la fermentación ruminal, son absorbidos en retículo, rumen y omaso llegando muy poca cantidad al abomaso. La mayoría del acetato y propionato llegan sin modificarse al hígado por la circulación portal, donde el acetato escapa a la oxidación y pasa a la circulación periférica y el propionato es transformado en glucosa; así mismo una pequeña cantidad de ambos es absorbida por la pared del rumen donde el acetato se convierte en cuerpos cetónicos y el propionato en ácido láctico. La producción de niveles adecuados de acetato en rumen resulta esencial para mantener cantidades adecuadas de grasa en la leche. El butirato se metaboliza en la pared del rumen transformándose en β-hidroxi butirato (cuerpo cetónico) muy importante como fuente de energía para el epitelio ruminal. (Church, 1993). Estos AGV son los que presentan mayor influencia en el valor del pH ruminal. Éste varía entre 5,8 y 7,0 y surge de la propia fermentación. Por un lado tenemos producción de una base como el N-NH₃

relacionada a la fermentación proteica, mientras que por otro lado tenemos la producción de ácidos como los AGV, cuya presencia en rumen aumenta cada vez que el animal ingiere alimento, lo cual provoca una disminución en el pH (Van Lier y Regueiro, 2008).

El balance entre las cantidades de ácidos y bases producidas, la velocidad con que ocurre esa producción, y la eficiencia de absorción de los mismos, forman la base del pH del rumen. Sobre esto operan los mecanismos fisiológicos que regulan el pH tendiendo a que no se excedan los límites fisiológicos. La dieta afecta el pH ruminal por diferentes vías. Los alimentos no inducen todos por igual a la rumia. La forma física de los alimentos es importante para inducirla de manera adecuada. El forraje tosco (fibroso) la estimula, mientras que los concentrados prácticamente no lo hacen. Durante la rumia se secreta gran cantidad de saliva que llega al rumen con la deglución del bolo alimenticio, ésta contiene bicarbonato y fosfato que le dan un pH alcalino (8,2 a 8,4) y que en el rumen actúan como tampón frente a la producción de ácidos. Cuando el rumiante consume concentrados la rumia disminuye y por lo tanto disminuye también la producción de saliva. Esto hace descender el pH ruminal (Van Lier y Regueiro, 2008).

En relación a las pasturas, a mayor calidad, menor contenido de fibra y mayor contenido de CHO solubles, lo que resulta en un menor pH ruminal (Rearte y Santini, 1989) lo cual lleva a un menor consumo de materia seca, menor digestibilidad de la fibra y esto hace que baje la producción de leche y aumenten los costos de alimentación (Allen, 1997). Un bajo valor de pH ruminal disminuye la motilidad en rumen, lo que logra que la capacidad de mezcla del mismo se vea disminuida, y la tasa de absorción es más lenta (Voelker y Allen 2003) El rumiante tiene varios mecanismos para mantener el pH ruminal dentro de rangos fisiológicos, entre ellos están la rumia, la salivación y la eructación. Durante la misma se secreta gran cantidad de saliva (aproximadamente 200L/día según la categoría animal y el tipo de forraje) que llega al rumen con la deglución del bolo alimenticio o de la rumia (Church, 1993). Cuando el rumiante consume concentrados la rumia disminuye y por lo tanto disminuye también la producción de saliva provocando así el descenso del pH ruminal. Durante la formación de AGV se genera CO_2 , entonces el rumiante para la eliminación de este gas, capta hidrogeniones del medio para formar metano y agua, reduciendo así la acidez. La eliminación de gas se realiza mediante la eructación.

Los rumiantes tienen la capacidad única de producir sin disponer de una fuente de proteína dietética debido a la síntesis de proteína microbiana en el interior del rumen (Church, 1993). Las proteínas de la dieta se descomponen entre un 30 y 70% en el rumen, sobre todo por efecto de las bacterias. El producto final es el N-NH_3 que se utiliza para la síntesis de proteína microbiana. Cuando hay una falta de energía fermentescible en rumen o cuando la proteína bruta (PB) de la dieta es excesiva, no todo el N-NH_3 producido en rumen puede ser convertido a proteína microbiana. El exceso de N-NH_3 es absorbido por la pared ruminal y transportado por la vena porta al hígado. Este convierte el N-NH_3 a urea que es liberada a la sangre; aquí sigue diferentes caminos: volver al rumen a través de la pared o llegar a glándulas salivares para luego ser deglutidas junto con el bolo alimenticio y ser

reutilizada por los m.o., o ser excretada por la orina vía renal. El otro destino son los riñones donde es eliminada en la orina (McDonald y col., 2006).

Las bacterias requieren dos sustratos para sintetizar sus proteínas somáticas, siendo estos las cadenas carbonadas y una fuente de N. Así, la producción ruminal de proteína puede verse afectada por desbalances entre ambos sustratos. Si el desequilibrio se debe a un exceso de nitrógeno, ya sea como proteína verdadera o como alguna fuente de NNP, aumentará la concentración ruminal de NH_4 (amonio) debido a que no es empleado para sintetizar proteínas bacterianas debido a la falta relativa de cadenas carbonadas. El exceso de NH_4 perjudica al animal en dos aspectos. Por un lado aumenta el pH ruminal y puede alterar su funcionamiento si éste supera el rango normal y por otra parte el NH_4 es absorbido por el rumen y detoxificado en el hígado, mediante la formación de urea, con el consecuente gasto energético adicional para el rumiante (Relling y Mattioli 2002).

La utilización óptima del N depende de la velocidad y cantidad de N producido y utilizado por los microorganismos. Las estrategias actuales de alimentación en vacuno lechero resultan con frecuencia en un aporte excesivo de N degradable en el rumen. Los trabajos de investigación sobre el control de la disponibilidad de N en el rumen se han centrado tradicionalmente en el procesado de los alimentos para reducir su degradación, en parte porque la manipulación de la actividad proteolítica del rumen es difícil (Broderick y col., 2003).

4.2 PASTURAS DE ALTA CALIDAD

Los sistemas más intensivos como la producción de leche, necesitan pasturas de alta calidad para satisfacer las necesidades del rodeo, siendo necesario en algunas etapas del ciclo productivo suplementar con granos u otros concentrados (Napoli y Santini, 1987). Cuando los rumiantes consumen pasturas templadas de alta calidad, están ingiriendo grandes cantidades de nitrógeno debido a que la proteína aportada por esta pastura es altamente soluble y de muy rápida degradación, dando como resultado altas concentraciones instantáneas de N-NH_3 a nivel ruminal (Repetto y Cajarville, 2009; Cajarville y Repetto, 2005). Como consecuencia, cuando los animales pastorean estas pasturas, sobre todo en estados de floración y pre-floración, el nitrógeno en el rumen es suficiente como para promover una elevada producción microbiana y por lo tanto el aporte de proteínas al rumiante (Repetto y Cajarville, 2009). La ingestión de pasturas templadas de alta calidad ocasiona mayores concentraciones de N-NH_3 ruminal y también promueve ambientes ruminales con menores pH y mayores concentraciones de AGV con menores relaciones acético/propiónico que los ideales (Rearte y Santini, 1989). Las pasturas usadas para vacas lecheras son comúnmente pasturas templadas, que se pueden describir como pasturas de alta calidad con 18 a 24% MS, 18 a 25% PB, 40 a 50% FDN, y valores de energía neta de lactación (ENL) de 1,53 a 1,67 Mcal/kg MS de (Clark y Kanneganti, 2011).

Las pasturas templadas varían en su composición química y el grado de degradación ruminal según la época del año en que sean consumidas y/o evaluadas

(Van Vuuren y col., 1993). La cantidad ofertada no es igual en todo el año, en los meses de menor temperatura hay una disminución del forraje y hacia el verano una disminución en la calidad nutricional. Por lo que se debe suplementar a los animales para que puedan cubrir sus requerimientos a lo largo del año y que expresen su mayor potencial genético (Mendoza y col., 2011). La producción anual de estas pasturas depende también de la fertilidad del suelo, condiciones ecológicas y climáticas (Rearte y Pieroni, 2001).

Haciendo referencia a estas pasturas templadas en el raigrás fresco los carbohidratos solubles (HCS) constituyen aproximadamente el 20% de la MS. Trabajos que se realizaron en Balcarce observaron que los animales que pastoreaban forrajes frescos mantienen a lo largo del día pH cercanos a 6 y aún menores. También se observó en dichos trabajos una importante proporción de ácido propiónico y butírico en el líquido ruminal, junto con altos valores de AGV totales (Napoli y Santini 1987). Asimismo el aporte de cantidades de fibra altamente degradable que contiene dicha pastura, lleva a que cuando los animales la consumen se produzcan altas cantidades de AGV, los cuales son responsables en última instancia de la disminución del pH ruminal (Cajarville y Repetto, 2005). Además, dado que la principal fuente de proteína para los rumiantes es la proteína microbiana, es necesaria para su obtención una correcta combinación de nutrientes no solo nitrogenados sino también energéticos (Stern y col., 1994).

El bajo consumo de MS ha sido identificado como el principal limitante de la producción de leche de vacas de alta producción en sistemas pastoriles (Kolver y Muller, 1998). Bargo y col. 2002a comprobó que el consumo de MS de vacas lecheras no suplementadas aumentó cuando la disponibilidad de pasturas se incrementó de 25 a 40 kgMS/vaca/día. A su vez Kolver y Muller, (1998) reportaron que vacas en lactancia temprana pastoreando una pastura de alta calidad en la primavera tuvieron un consumo de MS de 19 kg o 3,4% del PV (peso vivo). Sin embargo, cuando se las comparó con vacas con una dieta RTM los consumos de MS y ENL fueron menores en las vacas en pastoreo, en contra posición los consumos de PB y FDN no difirieron entre las vacas en pastoreo y las vacas en RTM. La diferencia en consumo de MS, fue el principal factor responsable de menor consumo de energía y producción de leche.

4.3 RACIONES TOTALMENTE MEZCLADAS y RACIONES PARCIALMENTE MEZCLADAS

Cuando hablamos de RTM hacemos referencia a un sistema de alimentación donde los alimentos concentrados son completamente mezclados, y son ofrecidos a los animales (Lammers y col., 2002). El uso de este tipo de dietas para la alimentación de vacas lecheras fue recomendado en países del Hemisferio Norte, a partir de la década de 1960 debido a que este sistema presenta varias ventajas como: a) ofrecer una dieta que aporte los nutrientes necesarios y una relación óptima de forraje/concentrado, b) minimizar la selectividad por componentes individuales, c) aumentar la producción de leche, d) mayor control de problemas digestivos y metabólicos, e) permite exactitud en la formulación y administración si se utiliza adecuadamente, y f) la mezcla de los alimentos colabora con el consumo de alimentos que normalmente no son agradables por su sabor (Lammers y col.,

2002). Además en este tipo de sistema de alimentación se logra que el animal consuma los nutrientes necesarios en cada bocado. (Mendoza y col., 2011)

Por otra parte el uso de RTM tiene ciertas desventajas como: a) el uso de algún tipo de equipo para la mezcla y el reparto de la RTM, b) instalaciones para la alimentación de los animales (corral o patio de alimentación), c) para el tratamiento de los efluentes generados; d) el almacenamiento de los alimentos sería un costo en la inversión de galpones o cualquier infraestructura (Lammers y col., 2002). Dentro de estas se podría considerar que es importante determinar la composición química de la RTM, evaluando el contenido de humedad que debería estar entre el 25-50% (Mendoza y col., 2011)

Un análisis comparativo del impacto ambiental de los actuales sistemas intensivos de producción de leche de EE.UU que se basaban en el uso de RTM y los sistemas tradicionales que utilizaban en su mayoría pasturas, revelo que los primeros requerían una menor cantidad de animales (-79%), alimentos (-77%), agua (-65%) y tierra (-90%) que los sistemas tradicionales para producir un billón de kilos de leche, y en consecuencia producirán una menor cantidad de efluentes (-76%), metano (-57%) y oxido nitroso (-44%) por cada billón de litros (Capper y col., 2011).

Cuando las vacas son alimentadas con RTM dependen totalmente del alimento que se les ofrezca en esta mezcla. Un componente fundamental en las estas dietas es maximizar el consumo de nutrientes de los animales para que así, se pueda explotar todo su potencial de producción. Para ello es necesario que la formulación de la dieta sea la adecuada para alcanzar los requerimientos planeados y que la dieta consumida por los animales sea lo más parecida a la dieta formulada (Mendoza y col., 2011).

Kolver y Muller (1998) compararon las ingestas de nutrientes en vacas Holando de alta producción, consumiendo pastura o RTM e identificaron los nutrientes que limitaban la producción de leche en vacas que consumían pasturas de alta calidad. Los resultados que obtuvieron fueron los siguientes: se redujo significativamente el consumo de materia seca de las vacas que consumieron pasturas en relación a las confinadas (19 vs 23,4 kg / d de MS), así como la producción de leche (29,6 vs 44,1 kg/d), el contenido de proteína en leche (2,61% frente a 2,80%), el peso vivo (562 vs 597kg) y la condición corporal (2,0 vs 2,5). Los autores concluyeron que la principal limitante para la producción de leche a partir de pasturas de alta calidad es la energía.

La suplementación de pastura con una RTM, es denominada por algunos autores como RPM (ración parcialmente mezclada) debido a que la pastura que consumen las vacas no es físicamente parte de la RTM (Bargo y col., 2002a). En lo que respecta a este tema se han realizado algunas investigaciones que combinan ambas alternativas (Bargo y col., 2002 a y b; Vibart y col., 2010; Morales y col., 2010). Bargo en su experimento del 2002a evaluó 3 dietas: a) RTM, b) pastura (mezcla gramíneas templadas) + RTM, y c) pastura + concentrado. En base a este trabajo realizado obtuvo los siguientes resultados. En lo que respecta a NH₃ ruminal fue menor en los tratamientos RTM y RTM + pastura, respecto a pastura +

concentrado. Pero no detecto diferencias en el pH, concentración o perfil de AGV. Los tres sistemas de alimentación que combinan pasturas y RTM tiene similar pH ruminal (5,87). La concentración de N-NH₃ ruminal fue mayor en el tratamiento P+C (pastura más concentrado) (19.9 mg/dl) comparado con los de RTM + pastura y RTM (10.2 mg/dl). La inclusión de RTM en el tratamiento de RTM + pastura redujo la potencialidad de degradar el total de la fracción de MS (85.5 vs. 82.3%) y la potencialidad de degradar la fracción FND de la pastura (82.1 vs. 74.9%). Por otro lado las vacas que fueron alimentadas con RTM produjeron la mayor cantidad de leche, grasa y proteína, las que consumieron pasturas + RTM tuvieron una producción intermedia, y las de menor producción fueron las que estaban con el tratamiento pasturas + concentrados.

En otro trabajo realizado por Vibart y *col.* (2010) utilizaron 4 dietas: 1) 100% RTM, 2) 85:15 RTM:pastura (raigrás anual), 3) 70:30 RTM:pastura, 4) 55:45 RTM:pasturas y observaron que la concentración de AGV total tendió a crecer a medida que aumentaba la proporción de pastura en la dieta. Dentro de estos AGV el acético y el propiónico disminuyeron y el butírico aumentó. No se obtuvieron diferencias significativas en cuanto al pH ni N-NH₃ en los cuatro tratamientos

Mendoza y *col.* (2012), en un trabajo donde se evaluó el desempeño productivo y el ambiente ruminal en vacas alimentadas con una dieta base de RTM, con acceso durante diferentes períodos RTM; RTM+ 4 horas de acceso al forraje fresco (FF); RTM+ 8 horas de acceso a FF a una pastura templada de alta calidad, reportan que el tiempo de acceso a un FF tuvo un marcado efecto en la dinámica ruminal de N-NH₃ y efectos más moderados en el pH de vacas lecheras alimentadas con RTM así como también cambios en la concentración total de AGV y en el patrón de fermentación.

La suplementación de pasturas templadas con RTM representa una alternativa poco estudiada hasta el momento, pero en los últimos años ha habido un creciente interés en el estudio de esta combinación de sistemas de alimentación. La suplementación de pasturas con RTM podría ayudar a tener buenos niveles de producción de leche y sólidos (García y Fulkerson, 2005), capitalizando los beneficios de una ración formulada y manteniendo las ventajas de la alimentación pastoril en cuanto a costos de producción (Wales y *col.*, 2013) y calidad del producto final (Morales y *col.*, 2010) Este sistema de alimentación combinando pasturas y RTM ya se observa en muchos establecimientos lecheros de la región. Una RPM correctamente formulada puede producir una fermentación más estable y con menos variaciones de pH que cuando el grano es suministrado en la sala de ordeño (Wales y *col.*, 2013). Por esta razón, se ha sugerido que el suministro de una RPM como suplemento del pastoreo puede conducir a mejorar la producción de leche en comparación con los concentrados suministrados en forma separada (Beever y Doyle, 2007).

5. HIPOTESIS

A medida que aumenta la proporción ofertada de forraje fresco en la dieta de vacas lecheras alimentadas con una dieta en base a una ración totalmente mezclada se producen cambios en el ambiente ruminal de los animales observándose una mayor concentración de N-NH_3 y menor pH ruminal acompañado de una mayor proporción de ácido acético y butírico y una menor proporción de ácido propiónico.

6. OBJETIVOS

6.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de suministrar distintas combinaciones de un forraje fresco de alta calidad y una ración totalmente mezclada sobre el ambiente ruminal de vacas lecheras de alta producción.

6.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

Evaluar el efecto de suministrar distintas combinaciones de un forraje fresco de alta calidad y una ración totalmente mezclada sobre el pH ruminal.

Evaluar el efecto de suministrar distintas combinaciones de un forraje fresco de alta calidad y una ración totalmente mezclada sobre la concentración de N-NH₃ ruminal.

Evaluar el efecto de suministrar distintas combinaciones de un forraje fresco de alta calidad y una ración totalmente mezclada sobre la concentración total y la proporción de AGV en rumen.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo experimental se llevó a cabo en la Unidad de Digestión y Metabolismo Ruminal en el Campo Experimental N°2 de la Facultad de Veterinaria, Universidad de la República (UdelaR), San José, Uruguay (34° S y 55° O) entre junio y agosto de 2012. Los análisis de composición química de alimentos se realizaron en el Laboratorio de Nutrición Animal de la Facultad de Veterinaria, Montevideo. El trabajo con animales fue realizado de acuerdo con la ordenanza sobre el uso de animales en experimentación, enseñanza e investigación (Comisión Honoraria de Experimentación Animal (C.H.E.A), UdelaR, y en el marco del protocolo de investigación aprobado por la Comisión de Experimentación en el Uso de Animales (CEUA; PI 12/13 Exp.111130-000818-13).

7.1. DISEÑO EXPERIMENTAL

Se utilizaron 12 vacas Holando multíparas, seleccionadas del rodeo del campo experimental, de 90 ± 22 días de lactancia, 523 ± 88 kg de peso vivo (PV) y 7908 ± 719 kg de leche de producción en la lactancia anterior (media \pm desvío estándar (DE)). Los animales fueron agrupados en un diseño de cuadrado latino de 3x3 por cuadruplicado, bloqueándolos en 4 cuadrados según su PV, producción al inicio del experimento, y producción en la lactancia previa; dentro de cada cuadrado se asignaron al azar los tratamientos: Tratamiento RTM100: oferta *ad libitum* de una RTM. Tratamiento RTM75: oferta equivalente al 75 % del consumo estimado de MS de la RTM utilizada en el Tratamiento 1 + oferta equivalente al 25% del consumo estimado de MS de forraje fresco de alta calidad. Tratamiento RTM50: oferta equivalente al 50 % del consumo estimado de MS de la RTM utilizada en el tratamiento 1 + oferta equivalente al 50% del consumo estimado de forraje fresco de alta calidad.

7.2. MANEJO DE LOS ANIMALES Y ALIMENTACIÓN

Los animales fueron alojados en bretes individuales, tuvieron libre acceso a agua fresca y fueron ordeñadas dos veces al día (7:00 y 18:00 h). El forraje fresco de alta calidad que fue utilizado fue raigrás anual (*Lolium multiflorum*), cultivar LE 284, con una disponibilidad inicial de 2500 kg de MS/ha; la composición química se describe en el cuadro I. El forraje fue cortado diariamente a las 11:00 h para los dos tratamientos que la consumían, a 10 cm del suelo con una segadora de discos, y fue ofrecida en comederos individuales. El forraje se conservó fresco durante todo el día debido a las bajas temperaturas ambiente registradas durante el período de experimentación (temperatura promedio 9° C, INIA Las Brujas, entre junio y agosto de 2012), y el sobrante de cada día se desechó al día siguiente previo a la hora cero de alimentación (08:00 h).

La RTM100 fue formulada y balanceada de acuerdo a las recomendaciones del NRC (2001) para cubrir los requerimientos de una vaca de 600 kg de peso produciendo 35 L de leche / día. La composición química de la pastura, la RTM y los ingredientes con que fue formulada la RTM, se presenta en el cuadro I, los

ingredientes de la RTM se presentan en el cuadro II. La cantidad de alimento se asignó a cada animal en función del consumo potencial individual, el cual se determinó durante 10 días previos a la adaptación del primer periodo. Para el tratamiento RTM100 se ofreció RTM como único alimento y en el caso de los tratamientos RTM75 y RTM50, se ofreció el 75% y 50% del consumo potencial de la misma RTM que en RTM100, complementando la dieta con forraje fresco. El promedio de oferta fue de 30 kg de MS por animal de los cuales el 75% era RTM y el 25% de forraje fresco para RTM75 y 50% RTM y 50% de forraje fresco para RTM50. Las horas dedicadas por los animales a consumir los alimentos en función a los diferentes tratamientos, teniendo como hora 0 de inicio de la ingesta las 08:00 h de la mañana, se describen a continuación: Para el tratamiento RTM100 a la hora 0 comenzó el inicio de la ingesta de RTM manteniéndose la misma durante las 24 h del día. El tratamiento RTM75 consumió desde la hora 0 a 2 RTM, desde la hora 2 a la hora 6 de iniciada la ingesta los animales consumieron FF, a partir de la hora 6 en adelante consumieron RTM. En el caso del tratamiento RTM50, desde la hora 0 a la hora 2 de iniciada la ingesta los animales consumieron RTM, a partir de la hora 2 hasta la hora 10 consumieron FF, y desde la hora 10 en adelante los animales consumieron RTM.

Cuadro I. Composición química¹ de la pastura (*Lolium multiflorum*), la RTM y de los alimentos utilizados para formular la RTM (media \pm desvío estándar).

	Forraje fresco ²	RTM ³	SMPE ⁴	GHM ⁵	HS ⁶
MS ⁷ (%)	17,5 \pm 5,2	38,1 \pm 1,8	23,2 \pm 1,5	78,4 \pm 0,9	90,0 \pm 0,1
<i>Composición (%MS)</i>					
MO ⁸	84,9 \pm 1,2	92,7 \pm 0,4	91,63 \pm 0,8	98,3 \pm 0,7	91,6 \pm 0,2
PB ⁹	15,1 \pm 2,7	18,0 \pm 0,8	8,10 \pm 0,1	9,5 \pm 0,2	50,3 \pm 1,1
FND ¹⁰	40,8 \pm 4,8	41,1 \pm 2,8	52,0 \pm 2,1	8,5 \pm 0,1	18,0 \pm 0,4
FAD ¹¹	24,1 \pm 2,4	24,6 \pm 0,3	31,0 \pm 0,9	2,2 \pm 0,2	6,7 \pm 0,1
CNF ¹²	26,3	31,7	29,3	79,3	21,3
EE ¹³	2,7 \pm 0,2	1,9 \pm 0,1	2,2 \pm 0,1	4,0 \pm 0,1	2,0 \pm 0,1
AS ¹⁴	20,0 \pm 0,7	4,2 \pm 0,3			
NDIN ¹⁵	0,7 \pm 0,1	0,7 \pm 0,1	0,4 \pm 0,0	0,4 \pm 0,0	1,4 \pm 0,1
NIDA ¹⁶	0,4 \pm 0,1	0,3 \pm 0,1	0,2 \pm 0,0	0,3 \pm 0,0	1,7 \pm 0,1
<i>Composición (Mcal/kg)</i>					
ENL ¹⁷	1,48	1,70			

¹Promedio de los tres periodos, ²Forraje fresco, *Lolium multiflorum* disponibilidad 2500 kg/MS/ha; ³Ración totalmente mezclada; ⁴Silo de maíz planta entera; ⁵Grano húmedo de maíz; ⁶Harina de soja; ⁷Materia seca; ⁸Materia orgánica; ⁹Proteína bruta; ¹⁰Fibra neutro detergente; ¹¹Fibra ácido detergente; ¹² Carbohidratos no fibrosos, calculado como: %CNF = %MO – (%PB + %FND + %EE); ¹³Extracto al éter; ¹⁴Azúcares solubles; ¹⁵Nitrógeno insoluble en detergente neutro; ¹⁶Nitrógeno insoluble en detergente ácido; ¹⁷Energía neta de lactación (Mcal/kg), según NRC (2001).

Durante dos días consecutivos de cada periodo se determinó el PV de todas las vacas con una balanza electrónica, a los efectos de utilizar esta información para calcular el balance energético y se estimó la condición corporal utilizando la escala de Edmonson y col. (1989). La RTM se mezclaba diariamente y se ofrecía según el tratamiento, reponiendo a medida que los animales la consumían.

Cuadro II. Ingredientes de la ración totalmente mezclada (RTM).

% de la MS	
Silo de Maíz planta entera	53
Grano húmedo de Maíz	23
Harina de Soja	22
Vitaminas ¹	0,01
Bicarbonato de sodio	0,60
Oxido de Magnesio	0,20
Fosfato di-cálcico	0,40
Cloruro de sodio	0,20
Carbonato de Calcio	0,20
Monensina ²	0,01
Secuestrante	0,04
Levaduras ³	0,01

¹Rovimix® Lecheras, DSM Nutritional Products Ltd. Basilea, Suiza

²Rumensin® 100 Premix, Elanco Animal Health, Greenfield, EEUU

³Procreatin 7 ®, Elanco Animal Health, Greenfield, EEUU

Los cambios en las dietas durante cada período de adaptación fueron realizados de forma progresiva. Cada período experimental tuvo una duración de 22 días, constando de 11 días de adaptación, seguido de 11 días de mediciones (Figura 1).

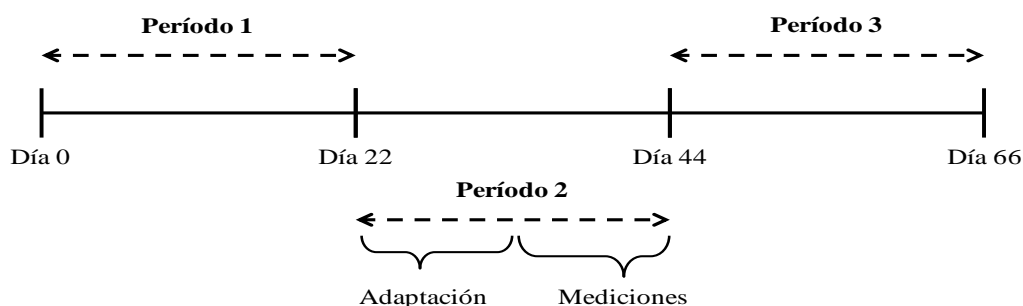


Figura 1. Esquema de determinaciones experimentales.

7.3. MEDICIONES Y CÁLCULOS

7.3.1. AGV, N-NH₃ y pH ruminal

Durante el día 9 de cada período, a cada hora y durante 12 horas consecutivas a partir de la hora 0 de iniciada la ingesta de alimentos (8:00 h) se colectaron muestras de líquido ruminal de 6 vacas fistulizadas en el rumen de las 12 vacas utilizadas en el experimento. El pH se midió inmediatamente con un pH-metro digital (EW-05991-36, Cole Parmer, EE.UU) y se colectó una alícuota de 10 ml que fue conservada en una solución de H₂SO₄ (50% V/V) y congelada a -18°C, para la posterior determinación de la concentración de N-NH₃ por destilación directa en micro-Kjeldahl (AOAC, 1995). Además, también se colectó una muestra de líquido ruminal de 1 mL, con 1 mL de ácido perclórico 0,1M como conservante, y se determinó las concentraciones de AGV totales e individuales (acético, propiónico, butírico) mediante HPLC (Dionex, Ultimate 3000) según la técnica descrita por Adams y col. (1984).

7.3.2. Composición química de alimentos

Durante los días 2 a 9 de cada período se colectaron muestras diarias de la RTM y el forraje fresco ofrecido y rechazado por los animales, que se utilizaron para confeccionar una muestra compuesta para cada período. Las muestras compuestas fueron congeladas, luego secadas a estufa a 65°C y se molieron en un molino con tamaño de malla de 1 mm. Previo a su análisis se determinó el contenido de MS, cenizas, MO (100-% cenizas), PB (N x 6,25) según (AOAC, 1990), nitrógeno insoluble en detergente neutro (Licitra y col., 1996), FND, FAD y LAD de acuerdo con la técnica descrita por Robertson y Van Soest (1981), usando un analizador de fibra Ankom220 (Ankom Technology Corp. Fairport, NY, USA). Las concentraciones de EE fueron determinadas utilizando un equipo para la extracción de grasas (Goldfish, Labconco 35001, Texas, USA) mediante un reflujo de éter de petróleo a 180°C durante 3 h, de acuerdo con la técnica descrita por Nielsen (2003) y el contenido de azúcares solubles (AS) siguiendo la técnica descrita por Yemm y Willis (1954). El contenido de carbohidratos no fibrosos y de ENL de los alimentos se calculó de la forma sugerida por el NRC (2001). Los análisis realizados en heces (MS, cenizas, FND, FAD) son los mismos que para los alimentos. Todas las muestras se analizaron por triplicado, aceptando coeficientes de variación entre análisis del 3 al 5 % según el parámetro.

7.3.3. Análisis estadísticos

Se utilizó un diseño de cuadrado latino, y los datos se analizaron con la versión 9.0 del software de SAS (SAS Institute Inc, Cary, NC, EE.UU.). 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).

Los resultados de las variables en cada período pH, N-NH₃, AGV se analizaron con un modelo lineal mixto como medidas repetidas en el tiempo, que incluyó los efectos fijos del tratamiento (T_k), período (P_j), hora de medición (H_i) (analizado como medidas repetidas) y su interacción con el tratamiento (T_k x H_m), y

vaca como efecto aleatorio (Kaps y Lamberson, 2007) usando el procedimiento PROC MIXED de SAS (2002) según el siguiente modelo:

$$ijklm = \mu + C_i + P_j + T_k + \text{Vaca}(C)z + H_l + T_k \times H_m + \epsilon_{ijklm}$$

Las medias de todos los parámetros evaluados fueron comparadas mediante el test de Tukey. Se aceptaron como diferencias significativas valores de P inferiores o iguales a 0,05 y como tendencia valores de P mayores a 0,05 y menores a 0,1.

8. RESULTADOS

Los valores promedios de pH de concentración de N-NH₃ y de AGV, se presentan en el cuadro III y las dinámicas de las variables de las mismas se muestran en la figura 2 y 3. Los valores de pH no tuvieron diferencias significativas si comparamos los tres tratamientos, 6,09 6,04 y 6,06 para RTM100; RTM75 y RTM50 respectivamente. Pero se detectó efecto de la interacción tratamiento x hora y efecto hora con $P < 0,001$. El pH presentó su máximo valor (6,26) a la hora 1 luego de iniciada la sesión de alimentación. El valor mínimo fue 5,77 a la hora 12.

Cuadro III. Valores promedio de pH, de concentración de N-NH₃ (mg/dL) ruminal, de concentración total de AGV (mmol/L) y diferentes proporciones de AGV en rumen en vacas alimentadas con diferentes proporciones de RTM y FF (RTM100, RTM75, RTM50).

	Tratamientos ¹			EEM	P ²		
	RTM100	RTM75	RTM50		T	T x H	H
pH	6,09	6,04	6,06	0,04	0,453	0,014	<0,001
N-NH ₃ (mg/dl)	20,50 ^a	18,24 ^a	14,82 ^b	1,89	<0,001	0,989	<0,001
AGV total mmol/L	116,13 ^a	116,55 ^a	120,89 ^a	8,78	0,860	0,941	0,385
Acético (A)	65,41	66,91	70,94	6,09	0,530	0,983	0,508
Propiónico (P)	37,62	33,75	32,91	2,93	0,318	0,955	0,256
Butírico (B)	13,09	15,87	16,99	2,37	0,146	0,256	0,047
Acético %	56,70	58,17	58,90	2,90	0,283	0,567	0,507
Propiónico%	32,37 ^a	28,56 ^b	27,20 ^b	1,44	<0,001	0,838	0,041
Butírico %	10,92 ^a	13,26 ^b	13,88 ^b	1,61	0,003	0,117	<0,001
Relación A/P	1,77 ^a	2,26 ^b	2,41 ^b	0,34	0,013	0,864	0,299
A+B/P	2,11 ^a	2,76 ^b	3,01 ^b	0,32	0,002	0,922	0,263

^{a,b} Letras diferentes en un mismo renglón indican diferencias significativas, $P < 0,05$.

¹ RTM100 = 100% RTM, RTM75 = 75%RTM + 25% forraje fresco, RTM50 = 50% RTM + 50% forraje fresco. EEM: error estándar de las medias² T= tratamiento, T x H= tratamiento x hora, H= hora

En lo que respecta a los valores de N-NH₃ se observaron diferencias significativas en el tratamiento ($P < 0,01$) y efecto hora ($P < 0,001$) pero no en la interacción tratamiento x hora. El N-NH₃ fue mayor en el tratamiento RTM100 respecto a RTM75 y RTM50, y a su vez RTM75 mayor que RTM50 (20,5; 18,2; 14,8 mg/dl). El mayor valor se presentó a la hora 0 de iniciada la sesión de alimentación con un valor de $23,70 \pm 1,89$ mg/dl y el menor valor se presentó a la hora 6 de iniciada la sesión de alimentación, presentando un valor de $14,99 \pm 1,89$ mg/dl.

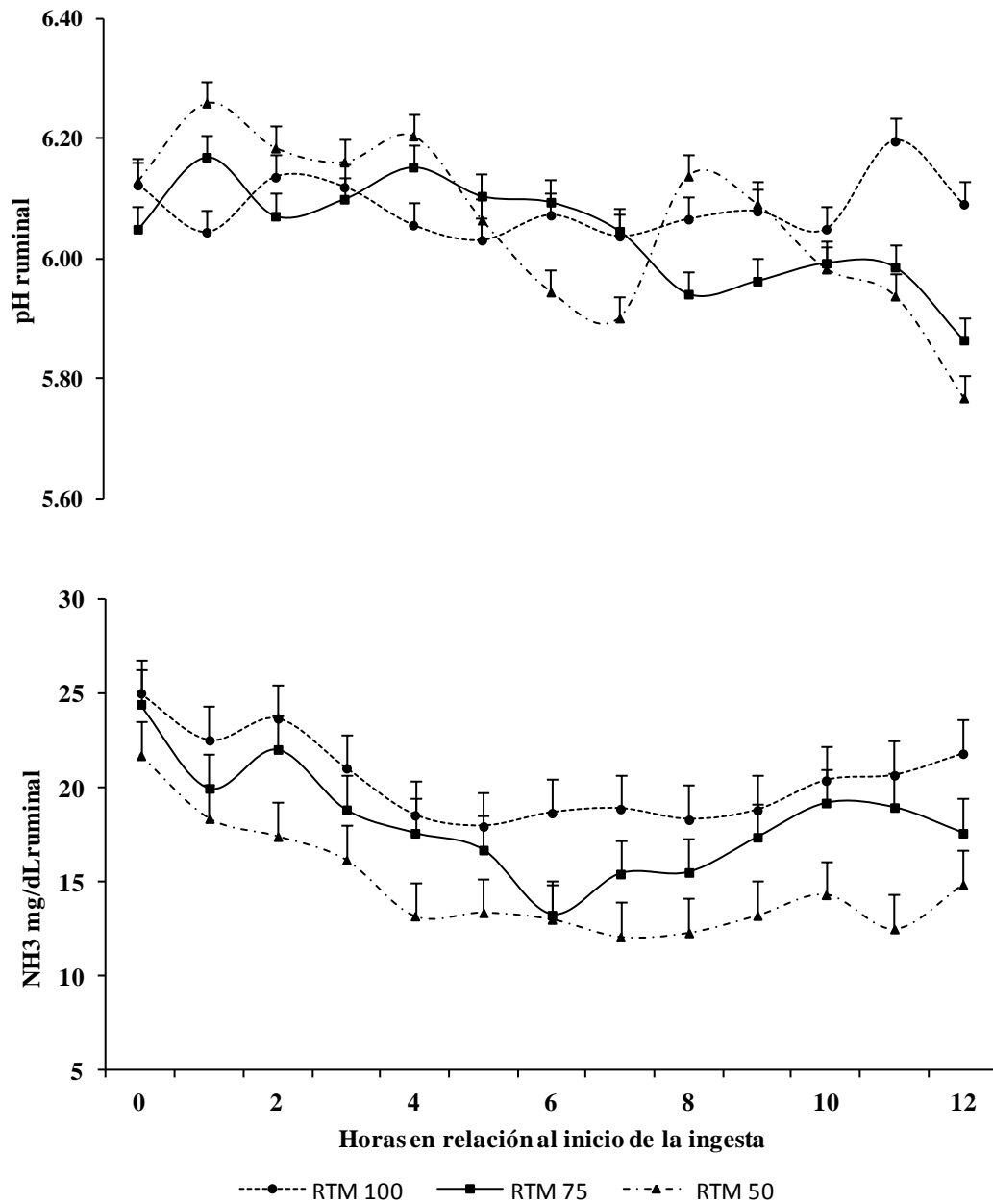


Figura 2. Dinámica de pH y de N-NH₃ (mg/dL) ruminal en vacas alimentadas con forraje alimentadas con diferentes proporciones de RTM y FF (RTM 100, RTM 75, RTM 50 respectivamente, media ± error estándar de la media). La hora 0 indica el momento de inicio de la ingesta. El eje de las ordenadas para el pH comienza en 5,6 y el eje de las ordenadas de N-NH₃ comienza en 5.

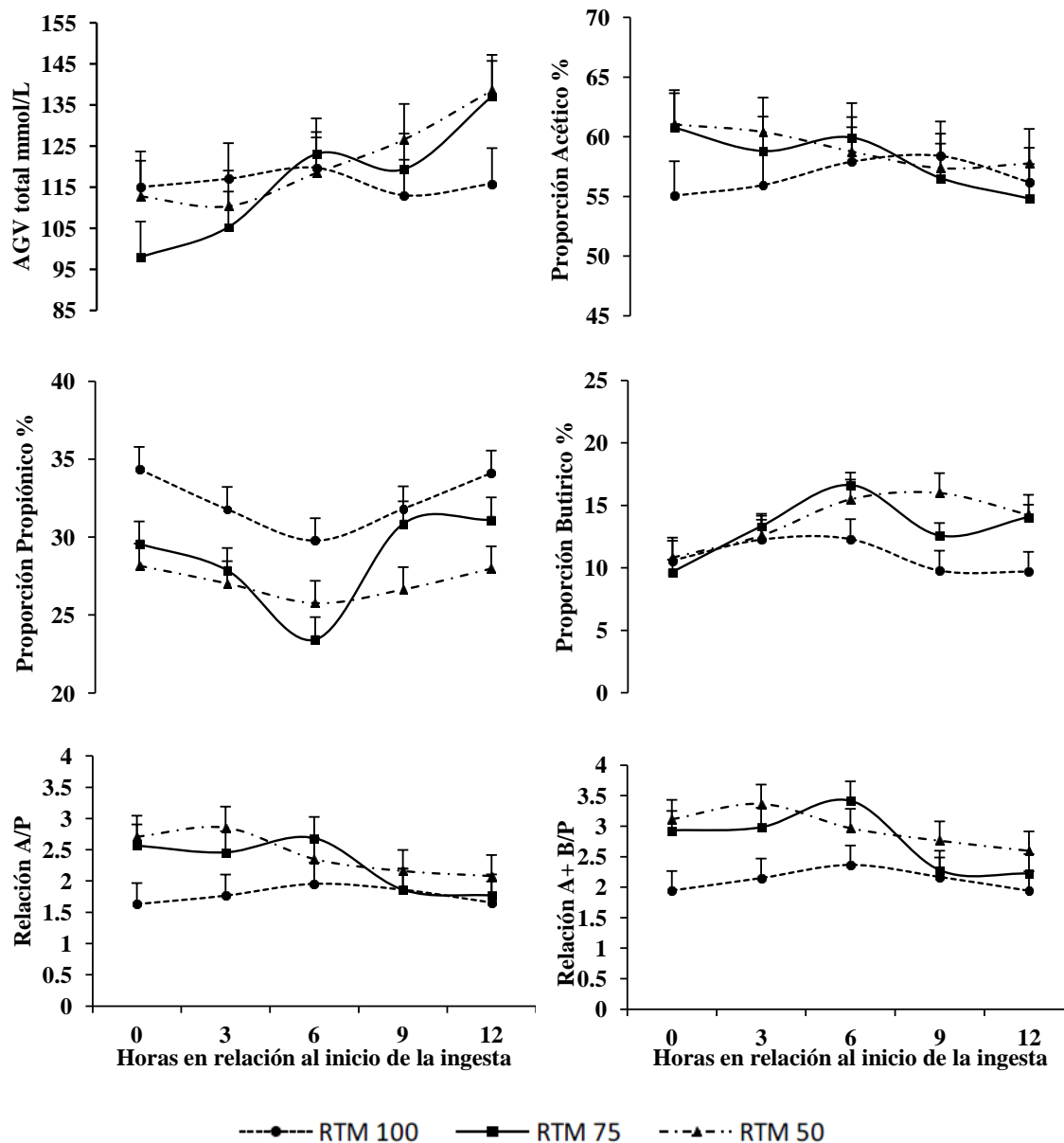


Figura 3. Dinámica de concentración total de AGV (mmol/L), proporción molar de acético, propiónico, butírico (%), relación A+B/P, y relación A/P en rumen de vacas alimentadas con forraje alimentadas con diferentes proporciones de RTM y FF (RTM100, RTM75, RTM50 respectivamente, media \pm error estándar de la media). La hora 0 indica el momento de inicio de la ingesta. El eje de las ordenadas para concentración total, proporción molar de acético y propiónico, comienza en 85, 45, 20 respectivamente.

En la concentración total de AGV (mmol/L) no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tres tratamientos ($117,8 \pm 8,78$). La concentración total de AGV no fue afectada por la hora ni presentó interacción tratamiento por hora. La concentración total de acético, ($67,7 \pm 6,09$ mmol/L), propiónico ($34,7 \pm 2,92$ mmol/L) y butírico ($15,3 \pm 2,37$ mmol/L) no varió entre los tres tratamientos (Cuadro III). La concentración total de acético y propiónico no fue afectada por la hora ni presentó interacción tratamiento por hora. La concentración

total de butírico fue afectada por la hora ($P < 0,05$) pero no presentó interacción tratamiento por hora. No se encontraron diferencias para la proporción de acético (media $57,9 \pm 2,90$ %) ni tampoco fue afectada por la hora ni presentó interacción tratamiento por hora, pero si para la proporción de propiónico ($P < 0,001$) que presentó su máximo valor cuando consumían RTM100 ($32,4 \pm 1,44\%$) con respecto a RTM75 ($28,6 \pm 1,44\%$) y a RTM50 ($27,2 \pm 1,44\%$). En la proporción molar de propiónico no se observó interacción tratamiento x hora y se vio afectada por la hora ($P = 0,04$). En lo que respecta a la proporción de butírico, se vio afectada por el tratamiento ($P < 0,001$) siendo el tratamiento RTM100 el que presentó menor proporción ($10,9 \pm 1,61\%$) con respecto a RTM75 ($13,3 \pm 1,61\%$) y a RTM50 ($13,9 \pm 1,61\%$) se observó diferencias en el efecto hora ($P < 0,001$) y no presentó interacción tratamiento x hora ($P > 0,10$)

La relación A/P fue afectada por los tratamientos ($P = 0,01$) presentando la menor relación el tratamiento RTM100 ($1,8 \pm 0,34$) con respecto al tratamiento RTM75 ($2,3 \pm 0,34$) y RTM50 ($2,4 \pm 0,34$). No se observaron interacciones tratamiento x hora para la relación A/P y tampoco fue afectado por la hora. La relación A+B/P fue menor en el tratamiento RTM100 ($2,1 \pm 0,32$) con respecto a RTM75 ($2,8 \pm 0,32$) y RTM50 ($3,0 \pm 0,32$). La relación A+B/P no se vio afectada por la interacción tratamiento por hora y tampoco fue afectado por la hora.

9. DISCUSIÓN

Los ruminantes poseen la capacidad de mantener el pH regulado a partir del equilibrio entre la producción de ácidos en la fermentación, la absorción de los mismos y el aporte de fosfatos y bicarbonatos proveniente de la saliva que actúan como tampones. Los valores de pH ruminal reportados en este trabajo, no presentaron diferencias significativas entre los tratamientos con valores promedio de $6,06 \pm 0,04$ siendo acordes a los reportados en la literatura para las características de los animales utilizados en este trabajo y la dieta suministrada. Los modelos *in vitro* y los estudios Kolver y de Veth (2002) sugirieron que la performance de las vacas en pasturas de alta calidad no fue comprometida por los bajos valores de pH ruminales (menores a 6,0). Trabajos que se realizaron en Balcarce observaron que los animales que pastoreaban forraje fresco mantienen a lo largo del día pH cercanos a 6 y aún menores. También se observó en dichos trabajos una importante proporción de ácido propiónico y butírico en el líquido ruminal, junto con altos valores de AGV totales (Napoli y Santini, 1987).

Mendoza y col. (2012), quienes trabajaron con 3 tratamientos (RTM, RTM + 4 horas de pastura y RTM + 8 horas de pastura) observaron que los valores de pH fueron mayores para los animales que consumieron mayor cantidad de pastura, lo cual difiere con los resultados encontrados en este trabajo. Las pasturas de alta calidad son las que producen mayor fermentación en rumen, y esto causa un aumento en los AGV y el pH por ende tiende a bajar. A pesar de que los animales consumieron altas proporciones de FF, no se observaron diferencias en los valores de pH entre tratamientos, esto podría ser explicado por qué el porcentaje de FND total de la dieta para los tres tratamientos no presentó variación (41%) (Pomiés, 2014). Existe una relación positiva entre el porcentaje de FND proveniente de forraje y el pH ruminal, debido a que la mayor masticación aumenta el flujo de sustancias tampones provenientes de la saliva, que además diluye los componentes de la alimentación más fermentables lo que reduce la producción de ácidos (Allen, 1997).

Es importante tener presente que uno de los principales factores que limita el consumo de MS en vacas lecheras es el alto contenido de FND en la dieta. En este trabajo no fue limitante debido a la alta digestibilidad que presentó tanto la MS, MO como la FND (Pomiés, 2014). EL NRC (2001) cita un mínimo de requerimientos de FND y FAD, y recomienda balancear de tal forma que el 75% de la FDN de la dieta provenga del forraje de manera de dar mejor aprovechamiento a las fuentes de fibra no provenientes de forraje y mejorar estimulación de la masticación y la rumia (Allen 1997).

Los bajos valores de H^+ ruminal son asociadas con altas concentraciones de AGV, la degradación ruminal de MO y la cantidad de la misma. También está relacionado con la disminución de grasa en leche, bajo contenido de FDN en forraje y la longitud de la partícula (Allen, 1997). Los valores de pH reportados para pasturas de alta calidad deben ser considerados bajos (Pitt y col., 1996), pero puede ser asociada con una alta digestibilidad *in vivo* (80% de digestibilidad de MO).

En un trabajo realizado por Vibart y col. (2010) se evaluaron 4 dietas por métodos de fermentación ruminal *in vitro*: 1) 100% RTM, 2) 85:15 RTM:pastura, 3) 70:30 RTM:pastura y 4) 55:45 RTM:pastura, y no observaron diferencias en el pH obtenido entre los distintos tratamientos. Al igual que en el trabajo realizado por Bargo, 2002 donde observo que en los tres sistemas de alimentación que combinan pasturas y RTM tuvieron similar PH ruminal (5,87). Los resultados de los trabajos anteriores coinciden con los resultados obtenidos en el presente trabajo.

La concentración total de AGV (mmol/L) no presentó diferencias entre los tres tratamientos y presentó valores promedio de $117,8 \pm 8,78$ mmol/L los que pueden ser considerados en base a la literatura valores medios y esperables para animales en estas condiciones. Según Kozloski (2011), la concentración total de AGV en el líquido ruminal normalmente varía entre 60 mmol/L y 160 mmol/l. Bargo en su experimento del 2002 evaluó 3 dietas: a) RTM, b) pastura (mezcla gramíneas templadas) + RTM, y c) pastura + concentrado. Los autores no detectaron diferencias en la concentración o perfil de AGV, lo que coincide con este trabajo ya que los valores de concentración total e individual de AGV no presentaron diferencias significativas. La proporción individual de acético no varió entre tratamientos presentando un valor promedio de $57,9 \pm 2,90$ %, sin embargo el tratamiento RTM100, presentó la mayor proporción de ácido propiónico debido a que los componentes de la dieta RTM100 presentan mayor cantidad de almidón, siendo este el principal precursor de este ácido. Por otro lado se obtuvo mayor proporción de ácido butírico en el tratamiento RTM50, presentando el mayor valor los tratamientos que presentaron consumo de forraje fresco RTM75 ($13,3 \pm 1,61$) y RTM50 ($13,9 \pm 1,61$) vs RTM100 ($10,9 \pm 1,61$). Este resultado era esperable debido a que el forraje fresco en la dieta presentó mayor proporción de azúcares solubles respecto a la RTM ($20 \pm 0,7$ vs $4,2 \pm 0,3$) estos serían los responsables de llevar a una fermentación más butírica.

La concentración media de N-NH₃ mg/dl en rumen fue menor para el tratamiento RTM 50 con respecto a RTM75 y RTM100. Lo esperable para estas condiciones es que a mayor proporción de forraje fresco en la dieta, mayor la concentración ruminal de N-NH₃. Trabajos realizados por los departamentos de Nutrición y Bovinos de la Facultad de Veterinaria de nuestro país con bovinos pastoreando praderas de gramíneas y leguminosas mostraron que las concentraciones ruminales de N-NH₃ alcanzaron un valor promedio de 20,1 mg/dl, producto del alto nivel de proteína bruta y la alta degradabilidad en este tipo de forrajes (Cajarville y Repetto 2006). A pesar de ello, las concentraciones de N-NH₃ ruminal en el presente experimento se encontraron por encima de los valores mínimos que aseguran una óptima síntesis de proteína microbiana (5-8 mg/dl) (Van Soest, 1994; Kaufmann y Saelzer, 1980), siendo el valor más bajo de N-NH₃ en rumen de $14,99 \pm 1,89$ mg/dl. El valor mínimo de N-NH₃ mg/dl en rumen fue para el tratamiento RTM 50 con un valor de 14,82 , y el máximo en la dieta RTM 100 con un valor de 20,50, encontrándose en la dieta RTM 75 el valor de 18,24. Estos valores de N-NH₃ concuerdan con los mayores niveles de urea en leche y urea en sangre medidos durante este ensayo experimental pero no reportados en este trabajo para los tratamientos RTM100 y RTM75 con respecto a RTM50. Los resultados de este trabajo coinciden con lo reportado por Mendoza y col. (2012) quienes reportan que

en vacas lecheras consumiendo RTM, RTM + 4 horas de pastura y RTM + 8 horas de pastura se observaron mayores concentraciones ruminales de N-NH₃ mg/dl en el tratamiento que no tuvo acceso a la pastura. Los autores atribuyen éstos resultado al mayor consumo de MS que presentó el tratamiento RTM. En el experimento de Bargo y col. (2002) la concentración de N-NH₃ ruminal fue mayor en el tratamiento P+C (19,9 mg/dl) comparado con los de RTM + p y RTM (10,2 mg/dl), lo cual no concuerda con los resultados obtenidos en nuestro trabajo, donde los mayores valores de N-NH₃ fueron en RTM100.

Kolver y Muller (1998) compararon las ingestas de nutrientes en vacas Holando de alta producción, consumiendo pastura o RTM e identificaron los nutrientes que limitaban la producción de leche en vacas que consumían pasturas de alta calidad. Los resultados que obtuvieron fueron los siguientes: se redujo significativamente el consumo de materia seca de las vacas que consumieron pasturas en relación a las confinadas (19,0 vs 23,4 kg / d de MS), así como la producción de leche (29,6 vs 44,1 kg/d), el contenido de proteína en leche (2,61% frente a 2,80%), el peso vivo (562 vs 597kg) y la condición corporal (2,0 vs 2,5). Estos datos coinciden con lo observado en nuestro trabajo donde los mayores consumos de materia seca se vieron en las vacas tratadas con RTM100. Este aumento en el consumo de MS (RTM100=24,8; RTM75=24,6; RTM50=22,9 kg/d; EEM=0,93) (Pastorini y col., 2014) podría explicar los altos valores de N-NH₃ en el tratamiento RTM100, ya que este mayor consumo determinó un mayor consumo de PB kg/día para RTM 100 (4,48 ± 0,25 kg/día) y RTM75 (4,22± 0,25 kg/día) respecto a RTM 50 que presentó el menor valor (3,77 ± 0,25 kg/día) (Pomiés, 2014). Además de las diferencias en el consumo de MS, el FF utilizado presentó menor % de PB (15,03 ± 2,7) con respecto a la RTM (18,01 ± 0,8). Además la RTM utilizada en este trabajo tenía una alta proporción de Harina de Soja (22% en base seca), la cual es rica en proteína degradable en rumen, lo que lleva a la formación de NH₃ en rumen.

10. CONCLUSIONES

Las diferentes combinaciones de forraje fresco y RTM mostraron diferencias moderadas sobre la fermentación ruminal de vacas lecheras. A mayor ingesta de forraje fresco se observó una disminución en la concentración ruminal de amoníaco y una mayor proporción relativa de ácido butírico. En los animales que consumieron exclusivamente RTM se observó una mayor proporción relativa de ácido propiónico. Si bien no se observaron diferencias sobre el pH ruminal entre animales alimentados con RTM o RTM y forraje fresco, se observaron oscilaciones a lo largo del día.

11.REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. A.O.A.C., (1995). Association of Official Analytical Chemist. Official Methods of analysis.16th ed. AOAC, Arlington VA.
2. Adams, R. F., Jones, R. L., Conway, P. L., (1984). High performance liquid chromatography of microbial acid metabolites. J Chromatogr. 336:127
3. Allen, M.S. (1997). Relationship between fermentation acid production in the rumen and the requirement for physically effective fiber. J Dairy Sci 80:1447–1462.
4. Bargo, F., Muller, L.D., Varga, G.A., Delahoy, J.E., Cassidy, T.W. (2002). 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.
5. Beever, D. E., Doyle, P.T. (2007). Feed conversion efficiency as a key determinant of dairy herd performance: a review. Aust .J. Exp. Agri. 47, 645–657.
6. Broderick. G. A. (2003). Effects of Varying Dietary Protein and Energy Levels on the Production of Lactating Dairy Cows. J. Dairy Sci. 86:1370–1381.
7. Cajarville C, Repetto J. (2005). Uso de concentrados para optimizar el aprovechamiento digestivo de las pasturas. XXXIII Jornadas Uruguayas de Buiatría. Paysandú, Uruguay, pp: 121-128.
8. 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. 48:35-39.
9. Capper, J.L., Cady R., Bauman, D. (2011). The relationship between cow production and environmental impact. WCDS Advances in dairy technology. Vol. 23: 167-179.
10. Chaudry, A.S. (2008). Forage based animal production systems and sustainability, an invited keynote. R. Bras. Zootec. 37 (Supl. E.): 78-84
11. Chilibroste, P., Soca, P., Mattiauda, D. (2012). Estrategias de alimentación en Sistemas de Producción de Leche de base pastoril. En: Pasturas 2012: Hacia una ganadería competitiva y sustentable. Balcarce: INTA. pp. 91-100.
12. Church CD, (1993): El Rumiante: Fisiología digestiva y nutrición. Zaragoza, Acribia, 641p.
13. Clark DA, VR Kanneganti. (1998). Grazing management systems for dairy cattle. En: Cherney JH y Cherney DJ (eds). Grass for Dairy Cattle. Pp 331 CAB International. Oxfor. U.K.
14. DIEA (2014). Uruguay; Ministerio de Ganadería Agricultura y pesca. Estadísticas agropecuarias. Montevideo, Uruguay, Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy>. Fecha de Consulta: 10/10/2015.
15. Edmonson, A.J., Lean, I., Weaver, L.D., Farver, T., Webster, G. (1989). A body condition scoring chart for Holstein dairy cows. J Dairy Sci 72: 68-78
16. Garcia, S.C., Fulkerson, W.J. (2005). Opportunities for future Australian dairy systems a review. Aust. J. Exp. Agric. 45: 1041-1055.
17. Kaps, M., Lamberson, W.R. (2007). Biostatistics for animal science. CABI Publishing. Wallingford, UK. 445 p.

18. Kaufmann W., Saelzer V. (1980). Fisiología digestiva aplicada al ganado vacuno. Zaragoza, Acribia. 85p.
19. 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.
20. Kolver, E.S., Muller, L.D., Barry, M.C., Penno., J.W. (1998). Evaluation and application of the Cornell Net Carbohydrate and Protein System for dairy cows fed diets based on pasture.
21. Kolver, E.S. (2003). Nutritional limitations to increased production on pasture-based systems. *Proc Nut Soc* 62: 291–300.
22. Kolver, E.S., de Veth, M.J. (2002). Prediction of ruminal pH from pasture-based diets. *J Dairy Sci* 85: 1255–1266.
23. Kozloski, G.V. (2011). Bioquímica dos ruminantes. 3ª edição. UFSM. Santa Maria. RS. 212 p.
24. Lammers, B.P., Heinrichs, A., Ishler, V.A. (2002). Uso de ración total mezclada (TMR) para vacas lecheras. Departamento de Ciencias Animales. Universidad estatal de Pensilvania. Disponible en: <http://extension.psu.edu/animals/dairy/nutrition/nutrition-and-feeding/diet-formulation-and-evaluation/uso-de-ration-total-mezclada-para-vacas-lecheras>
Fecha de consulta 01/11/15.
25. Licitra, G., Hernandez, T.M., Van Soest, P.J. (1996). Standardization of procedures for nitrogen fractionation of ruminant feeds. *Anim Feed Sci Technol* 57: 347-358
26. Mendoza A, Cajaville C, Santana A, Repetto J. (2011). ¿Hacia una nueva forma de pensar las 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.
27. Mendoza, A., Cajaville, C., Amaral, V., Piroto, E., Puig, M., Repetto, J.L., (2012). Concentración de Nitrógeno amoniacal y pH ruminal en vacas lecheras alimentadas con forraje fresco y ración totalmente mezcladas. *Veterinaria (Montevideo)* 48 (Suppl 1): 150
28. Merchen, N.R., Elizalde, J.C., Drackley, J.K. (1997) Current perspective on assessing site of digestion in ruminants. *J Anim Sci.* 75:2223-2234.
29. McDonald, P., Edwards, R.A., Greenhalgh, J.F.D., Morgan, C.A. (2006). *Nutrición Animal. Digestión*, 6a ed. Zaragoza, Acribia, p. 135-165.
30. Morales Almaraz, E., Soldado, A., Gonzalez, A., Martínez Fernández, A., Domínguez-Vara, I., de la Roza-Delgado, 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.
31. Nápoli G.M., Santini F.J. (1989) The Effect of a Protein Energy Supplement on Pasture Protein and Fibre Digestion in the Rumen of Grazing Steers
32. Nápoli G.M., Santini F.J. (1987). Dinámica de la digestión ruminal de forrajes frescos. *Rev. Arg. Prod. Anim.*; 7:431-447.
33. Nielsen, S.S. (Ed.), (2003). *Food analysis laboratory manual*. Kluwer Academic/ Plenum Publisher, Nueva York.
34. National Research Council. (2001). *Nutrient requirements of dairy cattle*. 7th revised edition. National Academy Press. Washington D.C., USA. 381 p.

35. Pastorini, M. Pomiés, N. Cajarville, C. Mendoza, A. Aloy, E. Bazzano, M. Calvo, M. Repetto, J.L (2014). Combinación de ración totalmente mezclada y forraje fresco: Efecto sobre el consumo, digestibilidad y eficiencia de utilización de la materia seca de vacas lecheras. V Congreso de la Asociación Uruguaya de Producción animal. Uruguay.
36. Pérez-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 en Nutrición de Rumiantes, Montevideo. Uruguay. 100 p.
37. Pitt, R.E., Van Kessel, J.S., Fox, D.G., Pell, A.N, Barry, M.C., Van Soest, P.J., (1996). Prediction of ruminal volatile fatty acids and pH within the net carbohydrate and protein system. *J. Anim. Sci.* 74:226-244.
38. Pomiés, N. (2014). Combinación de diferentes niveles de forraje fresco y ración totalmente mezclada en dietas de vacas lecheras: efecto sobre el aprovechamiento digestivo. Tesis de Maestría en Producción Animal. Montevideo. Uruguay. 52 p.
39. Rearte, D.H, Santini, F.J. (1989). Digestión ruminal y producción en animales a pastoreo. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 9:93-105.
40. Rearte, D.H.; Pieroni, G.A. (2001) Supplementation of temperate pastures. International Grassland Congress, 19, São Pedro. Sociedade Brasileira de Zootecnia, p 679-689.
41. Relling AE. Mattioli GA. (2002). Fisiología digestiva y metabólica de los rumiantes. La Plata, editorial EDULP, 72 p. En: <http://ecaths1.s3.amazonaws.com/catbioquimicavet/fisio%20dig%20rumiantes.pdf>. Fecha de Consulta: 10/06/2015.
42. 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.
43. Robertson, J.B., Van Soest, P.J., (1981). The detergent system of analysis and its application to human foods. En: *The analysis of dietary fiber in food.* Ed. WPT James, O. Theander, M. Dekker. N.Y.
44. Rushen, J., de Passillé, A.M., von Keyserlingk, M., Weary, D.M. (2008). Housing for adult cattle. En: *The welfare of cattle.* Amsterdam, Springer. Pp 142-180.
45. SAS. (2002). Statistical Analysis Systems Institute. SAS Version 9.
46. Stern M.S., Calsamiglia S., Endres M.I. (1994). Dinámica del metabolismo de los hidratos de carbono y del nitrógeno en el rumen. Universidad de Minnesota, EE.UU. X Curso de especialización de la Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal (FEDNA). Disponible en: <http://www.fundacionfedna.org/publicaciones>. Fecha de consulta: 10/07/15
47. Van Lier E., Regueiro M. (2008). Digestión en Retículo-Rumen. Facultad de Agronomía. Montevideo, Uruguay. Departamento de Producción Animal y Pasturas. 30 p.
48. Van Soest, P.J. (1994). Microbes in the gut. En Van Soest, PJ, *Nutritional Ecology of the Ruminant*, 2a ed. New York: Cornell University Press. pp: 253-280.
49. Van Vuuren A.M., Tamminga, S., Ketelaars, R.S., (1993). Ruminal Ryegrass versus Corn starch or beet pulp fiber diet effects on digestion and intestinal amino acids in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 76: 2692-2700.

50. 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.
51. Wales, W.J., Marret, L.C., Greenwood, J. S., Wright, M.M., Thornhill, J.B., Jacobs, J.L., Ho.C.K.M., Auld, M.J. (2013). Use of partial mixed rations in pasture based dairying in temperature regions of Australia. *Anim. Prod. Sci.* 53:1167-1178
52. Yemm, E.W., Willis, A.J., (1954). The estimation of carbohydrates in plant extract by anthrone. *Biochem J* 57:508.