



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

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

Nicolle POMIÉS FIGUEROA

TESIS DE MAESTRÍA EN PRODUCCIÓN ANIMAL

**URUGUAY
2014**



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

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

Nicolle POMIÉS FIGUEROA

Cecilia Cajarville, Prof. PhD José Luis Repetto, Prof. PhD Alejandro Mendoza, Msc
Director de Tesis Co-director Co-director

2014

INTEGRACIÓN DEL TRIBUNAL DE DEFENSA DE TESIS

AGRADECIMIENTOS:

Deseo expresar mi agradecimiento a todas las personas e instituciones que han colaborado en la realización de este trabajo, en especial:

A Cecilia y Joselo por haberme dado la oportunidad de realizar este trabajo y guiarme en su realización.

A Alejandro Mendoza por su paciencia, dedicación y siempre su pronta respuesta.

A todos los compañeros de Nutrición y Bovinos, Carolina, Martín, Germán, Álvaro, Alicia, Alejandro, Sebastián y especialmente a Analía, por su ayuda y por haberme apoyado en las diferentes etapas de este trabajo.

A los tesisistas que participaron en el trabajo, Irina, Valeria, Pilar, Irene, Mauricio, Emiliano, Mathías, Luis, William, Nadia, Matías y Yohana, sin ellos hubiera sido imposible realizar este trabajo.

A los funcionarios del campo experimental N°2, especialmente a Adriana por “aguantarnos”.

A Elena de Torres por su disposición y colaboración en el desarrollo del trabajo experimental.

A la ANII por su apoyo económico.

A mi familia y amigos.

A Maximiliano compañero de vida que me apoya en cada momento. Gracias.

TABLA DE CONTENIDO

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS	iii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	iv
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN:.....	3
ANTECEDENTES ESPECÍFICOS:	4
Producción de leche a base de pasturas templadas de alta calidad.....	4
Producción de leche a base de pasturas suplementadas con concentrados.....	5
Suplementación de pasturas con una RTM	7
1. Combinación de pastura y ración totalmente mezclada: Efectos sobre el consumo de los nutrientes y el comportamiento ingestivo de vacas lecheras.....	8
2. Combinación de pastura y ración totalmente mezclada: Efectos sobre el ambiente ruminal	9
En Resumen:.....	11
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	12
HIPÓTESIS	14
OBJETIVOS	14
MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
Diseño experimental	15
Manejo de los animales y alimentación.....	15
Mediciones y cálculos:	18
1. Consumo de los nutrientes	18
2. Comportamiento ingestivo y tasa de consumo	18
3. AGV, N-NH ₃ y pH ruminal.....	18
4. Digestibilidad de los nutrientes	19
5. Balance de energía.....	19
6. Composición química de alimentos	20
Análisis Estadísticos	20
RESULTADOS	21
Comportamiento ingestivo y tasa de consumo.....	21
Consumo de los nutrientes.....	23
Balance de Energía	25
Digestibilidad de los nutrientes	25
Ambiente ruminal	26
CONCLUSIONES.....	37
IMPLICANCIAS	39
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

	Página
Cuadro I. Composición química de la pastura (<i>Lolium multiflorum</i>), la RTM y de los alimentos utilizados para formular la RTM.	16
Cuadro II. Ingredientes de la ración totalmente mezclada (RTM).	17
Cuadro III. Proporción de tiempo dedicado a cada actividad, tiempo dedicado a comer según alimento, tasa de consumo y tasa de consumo según alimento registrado durante las primeras 12 h pos inicio de la ingesta en vacas alimentadas con diferentes proporciones de RTM y FF (RTM 100, RTM 75, RTM 50).	21
Cuadro IV. Consumo diario de las distintas fracciones del alimento en vacas alimentadas con diferentes proporciones de RTM y FF (RTM100, RTM75, RTM50).	24
Cuadro V. Balance de Energía en vacas alimentadas con diferentes proporciones de RTM y FF (RTM100, RTM75, RTM50).	25
Cuadro VI. Digestibilidad aparente de las distintas fracciones del alimento en vacas alimentadas con diferentes proporciones de RTM y FF (RTM100, RTM75, RTM50).	26
Cuadro VII. 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).	27
Figura 1. Esquema de determinaciones experimentales	17
Figura 2. Proporción de animales comiendo durante las primeras 12 h pos inicio de la alimentación en vacas alimentadas con diferentes proporciones de RTM y FF (RTM100, RTM75, RTM50 respectivamente, media ± error estándar de la media).	22
Figura 3. Tasa de consumo (kg MS/h) durante las primeras 12 h pos inicio de la alimentación en vacas alimentadas con diferentes proporciones de RTM y FF (RTM100, RTM75, RTM50 respectivamente, media ± error estándar de la media).	23
Figura 4. Dinámica de pH y de N-NH ₃ (mg/dL) ruminal en vacas alimentadas con forraje alimentadas con diferentes proporciones de RTM y FF (RTM100, RTM75, RTM50 respectivamente, (media ± error estándar de la media).	28
Figura 5. 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).	29

LISTA DE ABREVIATURAS

AGV: ácidos grasos volátiles
AS: Azúcares solubles
CC: condición corporal
CFADi: concentración fibra ácido detergente indigestible
CF: consumo de forraje
CNF: carbohidratos no fibrosos
CV: consumo voluntario
EE: extracto etéreo
EEM: error estándar de las medias
ENL: energía neta de lactación
FAD: fibra ácido detergente
FDAi: fibra ácido detergente indigestible
FF: forraje fresco
FND: fibra neutro detergente
LAD: lignina ácido detergente
MO: materia orgánica
m.o.: microorganismos
MS: materia seca
N-NH₃: nitrógeno amoniacal
N: nitrógeno
NIDA: nitrógeno insoluble en detergente ácido
NIDN: nitrógeno insoluble en detergente neutro
P: probabilidad
PB: proteína bruta
PBo: peso de bocado
PC: proteína cruda
PDR: proteína degradable en rumen
PM: proteína microbiana
PNDR: proteína no degradable en rumen
PV: peso vivo
RPM: ración parcialmente mezclada
RTM: ración totalmente mezclada
RTM100: RTM *ad libitum*.
RTM50: 50 % del consumo estimado de RTM + forraje fresco de alta calidad.
RTM75: 75 % del consumo estimado de RTM + forraje fresco de alta calidad.
SNC: sistema nervioso central
TB: tasa de bocado

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto de suministrar distintas combinaciones de FF de alta calidad en una dieta base a RTM sobre el aprovechamiento digestivo de vacas lecheras de alta producción. Se utilizaron 12 vacas Holando con 90 ± 22 días de lactancia, 523 ± 88 kg de peso vivo y 7908 ± 719 kg de leche de producción en la lactancia anterior, las cuales fueron alojadas en bretes individuales. Se utilizó un diseño de cuadrado latino 3 x 3 por cuadruplicado, asignándose los animales a uno de los siguientes 3 tratamientos: 1) RTM100: oferta ad libitum de una RTM; 2) RTM75: oferta equivalente al 75 % (del consumo estimado) de la RTM utilizada en el RTM100 + oferta equivalente al 25% de FF de alta calidad; y 3) RTM50: oferta equivalente al 50 % (del consumo estimado) de RTM utilizada en RTM100 + oferta equivalente al 50% FF de alta calidad. 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. La RTM fue preparada diariamente, y la pastura cortada y ofrecida diariamente. Se determinó comportamiento (clasificado según las categorías: “comiendo”, “rumiando” y “otros”), tasa de consumo, consumo y digestibilidad de los nutrientes, ambiente ruminal, y balance de energía. La proporción de tiempo dedicado a “comiendo” o “rumiando” no fue afectada por los tratamientos ($P > 0,10$). La tasa de consumo no fue afectada por el tratamiento ($P > 0,10$), sin embargo fue afectada por la hora ($P < 0,001$) y por la interacción tratamiento por hora ($P < 0,001$). El consumo de MO, CNF y PB (kg/día), fue significativamente menor para RTM50 en comparación con RTM75 y RTM 100 ($P < 0,001$). El consumo de FND fue mayor en RTM100 en comparación con RTM 50 ($P = 0,03$). La digestibilidad no presentó diferencias entre tratamientos para los diferentes nutrientes ($P > 0,10$) excepto para FND la cual tendió a ser mayor para RTM 100 ($P > 0,05$). El valor medio de pH, la concentración total de AGV (mmol/L) y la proporción molar de acético no fueron afectadas por el tratamiento ($P > 0,10$). El pH ruminal a lo largo del día en los animales RTM100 no varió, sin embargo en los animales del tratamiento RTM75 y RTM50 disminuyó después del comienzo de la alimentación con FF. La proporción molar de propiónico y butírico fue afectada por los tratamientos ($P < 0,001$) siendo el tratamiento RTM 50 presentó la menor proporción de propiónico y la mayor proporción de butírico. La concentración media de N-NH₃ en rumen fue menor para el tratamiento RTM 50 con respecto a RTM 75 y RTM 100 ($P < 0,01$). Se concluye que es posible combinar FF hasta en un 30% de la dieta total con una RTM sin deprimir el consumo total de nutrientes. Por encima de este nivel, el consumo de nutrientes disminuyó, asociado a una reducción en la tasa de consumo cuando los animales tenían acceso al FF, pero no a cambios en la proporción de tiempo destinado a alimentarse. Las diferentes combinaciones de FF y RTM no afectaron la digestión de los nutrientes y tuvieron efectos moderados sobre la fermentación ruminal.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effect of providing different combinations of high-quality fresh forage and total mixed ration on digestive utilization in high producing dairy cows. Twelve dairy cows of 90 ± 22 DIM, 523 ± 88 BW and 7908 ± 719 kg of milk production in the previous lactation were used on a four 3 X 3 latin square design. Animals were housed in individual stalls and were assigned to one of the following treatments: 1) TMR 100, *ad libitum* access to TMR, 2) TMR 75: 75% of the estimated intake of the TMR 100 + 25% fresh forage estimated intake, and 3) TMR 50: 50% of the estimated intake of TMR used in TMR 100 + 50% fresh forage estimated intake. The experiment lasted a total of 66 days, divided into 3 periods of 22 days each, where the first 11 days were for adaptation and the following 11 days of measurements. The TMR was prepared daily, and the pasture cut and offered daily. Nutrient intake and digestibility, intake rate, ruminal environment and energy metabolism were evaluated. In addition, the activities of each animal (classified according to the categories: "eating", "ruminating" and "others") were recorded. Intake rate was not affected by treatment, but was affected by hour ($P < 0.001$) and interaction between treatment and hour ($P < 0.001$). The proportion of time spent on each activity was not affected by treatment ($P > 0.10$). Neutral fiber detergent intake was higher on TMR100 compared to TMR50 ($P = 0.03$). The organic matter, nonstructural carbohydrate and crude protein intake was lower ($P < 0.001$) on TMR50 compared with TMR75 and TMR100. The digestibility was not affected by treatments ($P > 0.10$) but NDF digestibility tended to be higher for TMR100 ($P > 0.05$). Mean pH value, total concentration of volatile fatty acids (mmol/L) and molar ratio to acetic were not affected by treatments ($P > 0.10$). Ruminal pH throughout the day in the RTM100 was unchanged, however on RTM50 and RTM75 ruminal pH decreased after the start of fresh forage supply. The molar ratio to propionic and butyric was affected by treatments ($P < 0.001$): TMR50 had the lowest proportion of propionic and the highest butyric proportion. The mean concentration of ruminal N-NH₃ was lower for the TMR50 than TMR75 and TMR 100 ($P < 0,01$). We conclude that it is possible to combine TMR and fresh forage up to 30% of the diet total DM, without negative effects on total nutrient intake. Above this level, nutrient intake was decreased, which was associated with a reduction on intake rate, with no changes in the proportion of time animals spent feeding. Different combinations of fresh forage and TMR did not affect nutrient digestion and had moderate effects on ruminal fermentation.

INTRODUCCIÓN:

En Uruguay la base alimenticia de la producción animal es principalmente pastoril. A pesar de la marcada intensificación que ha sufrido la lechería en la última década a nivel nacional, la producción de leche en base a pasturas sigue siendo muy importante debido a la mejor relación costo/beneficio, y es por ello que la producción de leche acompaña la producción estacional de las pasturas. Sin embargo, los análisis de las curvas de lactancia sugieren que los animales no logran expresar su potencial productivo, seguramente en respuesta al desacople entre los requerimientos y la oferta de nutrientes, y el ambiente productivo. Ello es debido a que los sistemas de producción de leche en la región exhiben un desbalance estructural 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 et al., 2012). Además, como los alimentos siguen siendo el componente más alto de los costos totales de los sistemas de producción lecheros, es importante determinar qué estrategia optimiza la eficiencia de conversión de estos alimentos en leche (Doyle et al, 2004; Beever & Doyle, 2007).

Cuando se suplementan con grandes cantidades de granos a vacas lecheras en pastoreo, además de efectos de sustitución, se pueden generar ineficiencias a nivel ruminal y disminuir el aprovechamiento digestivo de los alimentos. Los sistemas de alimentación que utilizan RTM ofrecen la posibilidad de suministrar los alimentos en forma conjunta aportando un adecuado balance de nutrientes si esta es formulada con precisión. Cuando estas RTM son combinadas con sesiones de pastoreo se conocen como raciones parcialmente mezcladas (RPM) (Bargo et al., 2002a). Una RPM correctamente formulada puede producir una fermentación más estable y con menos variaciones de pH, esta mayor estabilidad del ambiente ruminal conduciría a optimizar la digestión de los nutrientes que cuando el grano es suministrado en la sala de ordeño. Por esta razón, se ha sugerido que el suministro de una RPM como suplementos a pastoreo puede conducir a mejorar la producción de leche en comparación con los concentrados suministrados en forma separada (Beever & Doyle, 2007).

En esta línea se han realizado algunos trabajos a nivel nacional en vacas lecheras (Mendoza et al., 2012abc; Sprunck et al., 2012; Fajardo et al., 2012). Tomados en conjunto estos trabajos reportan una disminución del consumo de MS a mayor cantidad de MS consumida proveniente de pasturas. Mendoza et al. (2012c), 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 a una pastura templada de alta calidad, reportan que el tiempo de acceso a un forraje fresco tuvo un marcado efecto en la dinámica ruminal de N-NH₃ y efectos más moderados en el pH de vacas lecheras alimentadas con RTM. En este trabajo también se reporta que el comportamiento de los animales se vio afectado según los diferentes tiempos de acceso a pastura, los animales aumentaron el tiempo que dedicaban a comer en detrimento de las otras actividades a mayor tiempo de acceso a la pastura (Mendoza et al., 2012a).

ANTECEDENTES ESPECÍFICOS:

Producción de leche a base de pasturas templadas de alta calidad.

En las producciones semi-intensivas como la lechería, las pasturas de alta calidad representan alrededor del 50% de la dieta. Esto se debe no solamente a la mejor relación costo/beneficio de la alimentación pastoril sino también a la contribución al medio ambiente, al bienestar animal y a la diferencias en la calidad del producto final y a sus propiedades nutraceuticas (Chaudry, 2008). Los sistemas pastoriles pueden tener beneficios sobre la salud de los animales, respecto a sistemas de confinamiento, y desde este punto de vista se considera que promueven un mayor bienestar de los mismos (Rushen et al., 2008). Adicionalmente, las pasturas son usualmente un alimento más económico que las RTM (Dillon, 2006) y es probable que sigan ocupando un lugar importante en la alimentación de los rumiantes debido a la creciente demanda mundial por los granos para la alimentación humana y a la fabricación de biocombustibles (Auld et al., 2013).

Las variaciones estacionales en disponibilidad y los cambios en la composición química de las pasturas hacen difícil predecir el consumo de nutrientes en animales a pastoreo. El consumo de MS ha sido identificado como la principal limitante en la producción de leche de vacas de alta producción en sistemas pastoriles llegando en condiciones óptimas a consumos de 3,25 a 3,5% del peso vivo (Kolver & Muller, 1998; Bargo et al., 2002). Esto es debido a restricciones de tipo físicas (digestión y pasaje de material por el tracto digestivo), por limitación de tiempo (para actividades de búsqueda, cosecha y rumia del forraje ingerido), y por la alta cantidad de agua ingerida junto a la pastura (Dillon, 2006). Por lo tanto, el consumo de energía que las vacas pueden alcanzar en pastoreo es menor respecto a cuando son alimentadas con RTM, y en consecuencia, el potencial de producción de leche no se explota completamente (Kolver & Muller, 1998; Kolver, 2003) especialmente en la lactancia temprana (Morales et al., 2010). Las vacas en pastoreo también presentan costos de energía que no están presentes en situaciones de confinamiento y que están vinculados a las caminatas y a la búsqueda y cosecha de la pastura (Kolver, 2003). Analizando diferentes trabajos, Van Vuuren et al. (2006) indican que en pastoreo el aporte de energía en promedio alcanza para una producción de entre 17 y 25 kg por día por vaca. Según Doyle et al. (2001), la producción de leche a pastoreo es menor a 30 kg por día por vaca debido a las variaciones estacionales, a las características nutritivas y de crecimiento de las pasturas.

Cuando el rumiante consume forrajes provenientes de pasturas templadas, ya sean praderas mezcla de gramíneas y leguminosas o verdes, en general ingiere altas cantidades de PB (Nápoli & Santini, 1988ab; Khalili & Sairanen, 2000; Repetto et al., 2001; Cajarville et al., 2006) la que a su vez es altamente soluble y de rápida degradación ruminal (Cohen, 2001; Repetto et al., 2005), generando elevadas concentraciones instantáneas de N-NH₃ (Khalili & Sairanen 2000; Cajarville et al., 2006). Además, este tipo de pasturas aporta niveles de fibras que oscilan entre 40-45 % de FND, gran parte de las cuales son potencialmente degradables en rumen (55-70 % de la FND) (Repetto et al., 2011). Los niveles de AS de estas pasturas pueden variar entre 7 y 11 %, dependiendo fundamentalmente de la época del año y del momento del día (Antúnez & Caramelli, 2009). Trabajos recientes realizados por los Departamentos de Bovinos y Nutrición Animal de Facultad de Veterinaria con bovinos y ovinos reportan altos niveles de AGV (Pérez-Ruchel, 2006; Aguerre et al., 2013) y N-NH₃ con valores

que oscilan entre 15 y 45 mg/dL (Pérez-Ruchel, 2006; Cajarville et al., 2006; Aguerre et al., 2009; Aguerre et al., 2013) en rumen, y una elevada digestibilidad del alimento (Aguerre et al., 2009; Pérez-Ruchel et al., 2012; Tebot et al., 2012; Aguerre et al., 2013), en animales consumiendo pasturas templadas de alta calidad

Sin embargo la concentración energética de los forrajes templados de alta calidad y sus altos contenidos de humedad y fibra puede resultar en bajos consumos de MS y energía (NRC, 2001). Esto, junto a las variaciones en la disponibilidad de forraje que se dan en las diferentes épocas del año, ha llevado al desarrollo de sistemas de alimentación que combinan pasturas y cantidades variables de suplemento en la dieta

Producción de leche a base de pasturas suplementadas con concentrados

El ganado lechero a pastoreo ha sido suplementado con diferentes tipos de concentrados, o con concentrados y mezclas de forrajes con el objetivo de mejorar el aporte de energía, de proteínas o ambos (Van Vuuren et al., 2006). Teóricamente, dado que las pasturas templadas de alta calidad son un alimento rico en proteína muy degradable en rumen, la adición de un grano rico en energía complementaría la dieta y de esa manera mejoraría el uso global de los nutrientes y la eficiencia alimenticia. Cuando se suplementa a vacas lecheras en pastoreo, dos tipos de interacciones deben ser tenidas en cuenta: la sustitución y los efectos asociativos entre los alimentos durante la digestión (Doyle et al., 2001). Estas interacciones pueden repercutir en cambios en el consumo, en el ambiente ruminal, en la digestibilidad total de la dieta y de las distintas fracciones del alimento (Dixon & Stockdale, 1999).

Cuando se suplementa una pastura templada de alta calidad con un concentrado energético se observa un incremento en el consumo de MS total (Bargo et al., 2002c; Bargo et al., 2003). Sin embargo la suplementación de pasturas templadas con concentrados en base a granos normalmente repercute en una disminución del consumo de forraje (Bargo et al., 2002; Bargo et al., 2003). Este efecto es conocido como tasa de sustitución. La tasa de sustitución se entiende por la reducción en los kg de MS de pastura por kg de suplemento, y está fuertemente afectada por la asignación de pastura (Van Vuuren et al., 2006). Bargo et al. (2003), indican que diversos trabajos en pastoreo que evaluaron el efecto de disponibilidad de pastura sobre la tasa de sustitución y la respuesta a la suplementación en vacas lecheras de alta producción, reportan que la tasa de sustitución aumentó y la respuesta a la suplementación disminuyó a medida que la disponibilidad de pastura aumentó. La tasa de sustitución es el principal factor que explica la variación observada en respuesta en producción de leche a la suplementación, existiendo una relación negativa entre tasa de sustitución y respuesta en leche (Bargo et al., 2003).

En cuanto el efecto de la suplementación sobre el comportamiento a pastoreo Bargo et al. (2003), al analizar diferentes trabajos, indican que la suplementación con concentrados no afectó la tasa de bocados o el peso de bocados, pero sí redujo el tiempo de pastoreo en comparación con dietas solo pastoreo, disminuyendo en promedio 12 minutos por día por cada kg de concentrado suplementado.

Un aumento en la digestibilidad total puede ser esperado con la inclusión de concentrados en la dieta porque estos últimos son usualmente mayores en digestibilidad que la pastura. Sin embargo, interacciones entre la digestión de concentrados y pastura

pueden reducir la digestión de la fibra. La energía provista por el concentrado (carbohidratos fermentables) puede resultar en reducciones en pH ruminal, lo cual puede disminuir la actividad o el número de bacterias celulolíticas, reducir la tasa de digestión de la fibra de la pastura y por lo tanto reducir el consumo de MS de la pastura (Dixon & Stockdale, 1999).

La inclusión de concentrados en dietas de animales consumiendo pasturas templadas de buena calidad, no ha demostrado tener un efecto consistente sobre el pH ruminal (Bargo et al, 2003) pero determina una caída en la concentración de N-NH₃ en rumen (Álvarez et al., 2001; Bargo et al., 2002c). Si bien la producción de AGV total no se modifica mayormente, el perfil de AGV en rumen se altera, disminuyendo la relación acético/propiónico (A/P).

Para una óptima síntesis de proteína microbiana a nivel ruminal es necesario lograr un equilibrio a través de la sincronización de los carbohidratos y la proteína en el rumen. Esto implica la optimización tanto en cantidades de carbohidratos y proteínas disponibles, así como también en sus respectivas tasas de degradación a nivel ruminal (Hoekstra et al., 2007). En este sentido, una de las principales determinantes de la síntesis de proteína microbiana a nivel ruminal es la disponibilidad ruminal de sustratos energéticos; por eso se ha planteado que la utilización de concentrados ricos en energía fermentescible hace más eficiente la captura del N producido a nivel ruminal a partir de pasturas de alta calidad (Gehman et al., 2006).

Cuando el suministro de energía disponible en rumen (carbohidratos solubles) es lo suficientemente alto, los aminoácidos tomados por la microbiota ruminal pueden ser incorporados en proteína microbiana. Sin embargo cuando la disponibilidad de carbohidratos solubles es baja, los aminoácidos y/o los carbohidratos estructurales de las pasturas son utilizados por la microbiota ruminal para abastecerla de energía. Estos compuestos son de lenta degradación ruminal, y como resultado, puede haber falta de balance y asincronía entre N y energía disponible en el rumen (Nocek & Russell, 1988). En la producción de leche en base a pasturas, debido a las características nutricionales de las mismas, se presentan limitaciones que se relacionan con desequilibrios nutricionales y la asincronía entre el suministro de energía y de aminoácidos para la microbiota ruminal y los tejidos, dando lugar a ineficiencias en la utilización de nutrientes (Wales et al., 2013).

Los sistemas lecheros de la región utilizan dietas mixtas que combinan el pastoreo directo con el uso de concentrados y/o forrajes conservados en diferentes proporciones y suministrados separadamente. Esta forma de suministro de los concentrados, no ha demostrado que sea capaz de optimizar la potencialidad de ambos alimentos (pastura y concentrado) (Cajarville et al., 2012). Por ejemplo, diversos trabajos han demostrado que la eficiencia de síntesis de proteína microbiana y el ambiente ruminal no se han visto favorecidos al suplementar pasturas de alta calidad con concentrados (Aguerre et al., 2009; Aguerre et al., 2013; Tebot et al., 2012) cuando se compara con animales consumiendo solo pastura. Por lo tanto, elegir e implementar el sistema y la forma de como suministrar los alimentos de la forma más eficiente es un complejo desafío para productores y técnicos (Wales et al., 2013).

Suplementación de pasturas con una RTM

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. Los sistemas de alimentación tipo RTM, son cada vez más comunes en los tambos de nuestro país. En algunas ocasiones se utilizan como sustitutos del pastoreo en épocas de crisis forrajeras, pero también se utilizan como complemento de las pasturas, cuando la cantidad de estas últimas es limitada. Habitualmente estas raciones son formuladas cubriendo los requerimientos totales para todos los nutrientes.

Esta mezcla de los distintos ingredientes en una única ración tiene como ventaja la posibilidad de ofrecer una dieta con un aporte balanceado de nutrientes y una óptima relación forraje concentrado, y con mínima posibilidad de selección por componentes individuales de la ración (Gill, 1979; Coppock et al., 1981). Esto determina que la formulación de la dieta sea más precisa cuando se ofrece una RTM que cuando se ofrecen sus ingredientes por separado. Sin embargo este sistema tiene algunas desventajas, fundamentalmente del punto de vista de la salud y bienestar animal. Por ejemplo, la incidencia de mastitis es mayor (Washburn et al., 2002) y el menor espacio disponible por animal afecta su comportamiento natural (Charlton et al., 2011). También se reporta una mayor incidencia de desórdenes como laminitis (Olmos et al., 2009; Charlton et al., 2011) cetosis y acidosis (Charlton et al., 2011). La suplementación de pastura con una RTM, es denominada por algunos autores como RPM debido a que la pastura que consumen las vacas no es físicamente parte de la RTM (Bargo et al., 2002a).

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 & Fulkerson 2005), capitalizando los beneficios de una ración formulada y manteniendo las ventajas de la alimentación pastoril en cuanto a costos de producción (Wales et al., 2013) y calidad del producto final (Morales et al., 2010) Este sistema de alimentación combinando pasturas y RTM ya se observa en muchos establecimientos lecheros de la región.

En la literatura se encuentran diversos experimentos que han comparado estos dos sistemas RTM y pastura (Kolver & Muller, 1998; Soriano et al., 2001; Tucker et al., 2001; Bargo et al., 2002ab; Looor et al 2003; Fontaneli et al., 2005; Schroeder et al., 2005; Morales et al., 2010). Estos estudios han tenido diferentes enfoques, algunos comparando una dieta 100% RTM respecto a otra 100 % pastura (Kolver & Muller 1998, Schroeder et al 2005), otros combinando la RTM y la pastura según horas de acceso a la pastura (Soriano et al., 2001; Morales et al., 2010; Mendoza et al., 2012abc), o evaluando la suplementación de pasturas con RTM o concentrados (Bargo et al., 2002ab). Recientemente, en nuestro país, se comenzó a trabajar con bovinos lecheros alimentados con RTM y pasturas (Mendoza et al., 2012abc; Sprunck et al., 2012; Fajardo et al., 2012). En general, la mayoría de los estudios citados se han focalizado en variables de tipo productivo, pero solo algunos han estudiado los procesos de fermentación en rumen y de digestión y metabolismo de los nutrientes (Bargo et al., 2002a; Mendoza et al, 2012c), que expliquen los resultados productivos observados.

1. Combinación de pastura y ración totalmente mezclada: Efectos sobre el consumo de los nutrientes y el comportamiento ingestivo de vacas lecheras.

La predicción del consumo de materia seca y de los nutrientes es fundamental para conocer el desempeño animal. El CV en rumiantes es la integración multifactorial de eventos físicos, metabólicos y sociales (Forbes, 2005; 2007). Estos mecanismos regulan el CV a corto (comidas en el día), mediano (comidas entre días) y largo plazo (meses) (Mertens, 1996). Las señales de los distintos receptores viscerales (incluyendo señales generadas por numerosos metabolitos que interactúan a nivel del hígado y otros órganos que son sensibles a los flujos metabólicos), junto con señales procedentes de tejido adiposo, estímulos sociales y los factores ambientales, están integrados por el SNC de manera aditiva para generar una señal de "malestar" (Forbes & Provenza, 2000). El animal luego ajusta su comportamiento alimentario para ingerir una cantidad óptima y equilibrada de nutrientes, lo que se traduce en una reducción en el malestar (Forbes & Provenza, 2000; Forbes, 2005; 2007).

Los niveles de muchos metabolitos (ácido propiónico y ácidos grasos libres) y hormonas en la sangre (insulina, glucagón, colecistoquinina entre otras) vía SNC informan del estado metabólico del animal y regulan los niveles de alimentación a corto plazo. En el control a largo plazo de la ingesta y el peso corporal, la leptina es el principal vínculo entre el tejido adiposo y el SNC (Forbes, 2007). La FND es un factor que afecta el consumo voluntario, un exceso disminuye el consumo y una deficiencia afecta la digestión ruminal.

Los estímulos físicos y metabólicos son los factores dominantes que controlan el consumo de forraje en animales estabulados. En condiciones de pastoreo adquieren importancia aquellos factores relacionados al comportamiento ingestivo (Galli et al., 1996). Es por ello que en estas condiciones aumenta la dificultad de estimar el consumo de materia seca y nutrientes en comparación con los sistemas de alimentación de confinamiento (Vázquez & Smith, 2000; Doyle et al., 2001). Esto es debido a las características de la pastura tales como la composición química y concentración de nutrientes, la digestibilidad, la disponibilidad de la pastura y el manejo de pastoreo (Doyle et al., 2001). Un cambio en el valor nutricional de los alimentos lleva a cambios en el comportamiento ingestivo, lo que conduce a modificaciones en el consumo de materia seca por parte de los animales. El comportamiento ingestivo es naturalmente cíclico y el estudio del consumo de alimentos diario individual de los animales muestra una considerable variación en el día a día (Forbes & Provenza, 2000).

Allden & Whittaker (1970) consideran al consumo de forraje (CF) por un animal en pastoreo como el producto de tasa de consumo (g hora) y el tiempo de pastoreo (horas día) (TP), siendo aquella el producto de la tasa de bocado durante el pastoreo (TB), por el peso promedio del bocado (PB). Por lo tanto, el consumo de forraje diario puede ser expresado en la siguiente ecuación: $CF = TP \times TB \times PB$. El peso del bocado es la variable del comportamiento ingestivo con mayor relevancia, explicando el mayor porcentaje de la variación en el consumo diario de forraje (Galli et al., 1996).

Los rumiantes generalmente pasan gran parte del día en actividades de consumo y rumia, los cuales han sido relacionados con el nivel de consumo de alimento. En general, un aumento en el consumo de alimento resulta en un mayor tiempo de masticación total, principalmente para el caso de dietas basadas en forrajes (Doreau et

al., 2004). En pastoreo la suma del tiempo destinado a pastorear y rumiar es cercano al 70 % del día para vacas lecheras (Stockdale & King, 1984). Cuando los animales son alimentados con una RTM tienen la posibilidad de aumentar la tasa de consumo y reducir el tiempo de masticación (Kolver & Muller 1998) teniendo más tiempo para actividades de rumia y descanso (Charlton et al., 2011).

Según la bibliografía internacional, el pasaje de un sistema de tipo RTM total a uno pastoril va acompañado de una reducción en el consumo de MS (Kolver & Muller 1998; Bargo et al., 2002a; Schroeder et al., 2005; O'Neill et al., 2011), que a su vez se acompaña de una reducción en la producción de leche. De acuerdo con Kolver (2003), 61% de la diferencia en producción de leche entre sistemas se debe a un menor consumo de MS, 24% al costo de búsqueda y cosecha de pastura, y 12% al costo de excreción del exceso de urea formada en vacas a pastoreo. En el caso de los trabajos que comparan una RPM con una RTM total también se reportan disminuciones en el consumo de MS cuando aumenta la participación de la pastura en la dieta (Bargo et al., 2002a; Vibart et al., 2008; Muya et al., 2011); sin embargo, otros trabajos no reportan diferencias en el consumo de MS al comparar ambos sistemas de alimentación (Morales et al., 2010).

En cuanto al consumo de los nutrientes Kolver & Muller, (1998) indican que las vacas que consumieron pastura, consumieron 19% menos de MO y ENL en comparación con las que consumieron RTM, pero no hubo diferencias en los consumos de PC y FND entre ambos sistemas de alimentación. Cuando el consumo de nutrientes es expresado como % del peso vivo, los animales consumiendo pasturas tuvieron mayor consumo de PC y FND. Bargo et al., (2002a) reportan un menor consumo de ENL en los animales que consumieron pastura en comparación con los que consumieron RTM total y RPM, y un mayor consumo de PC para los animales que consumieron pasturas, lo que coincide con lo reportado por Muya et al. (2011).

Recientemente, en nuestro país se comenzó a trabajar con bovinos alimentados con RTM y pasturas (Santana et al., 2011; Mendoza et al., 2012; Sprunck et al., 2012; Fajardo., et al 2012). En estos trabajos, la combinación de RTM y pasturas aumentó el consumo de MS de los animales hasta niveles de más de 3,5 del PV, 24% superiores al nivel de consumo de los animales alimentados únicamente con RTM, y 44% superiores a los niveles de consumo alcanzados por los animales alimentados con forraje como único alimento (Santana et al., 2011).

2. Combinación de pastura y ración totalmente mezclada: Efectos sobre el ambiente ruminal

La estrategia alimentaria de los rumiantes se basa en la simbiosis establecida entre los m.o. y el huésped, este sistema de fermentación es previo a la acción de las propias enzimas digestivas. Este complejo ecosistema microbiano compuesto básicamente por bacterias estrictamente anaerobias, arqueas, protozoarios y hongos mantienen determinadas condiciones de anaerobiosis, temperatura y humedad. La fermentación de alimentos en el rumen produce AGV de cadena corta principalmente acético, propiónico y butírico, así como también dióxido de carbono, metano, amoníaco, y en ocasiones ácido láctico.

Los carbohidratos de la dieta (celulosa, hemicelulosa, almidón, pectina y azúcares solubles) son los principales sustratos para la fermentación. Estos son fermentados hasta hexosas y pentosas y luego a AGV vía piruvato. Además de carbohidratos, los lípidos y las proteínas de la dieta también dan lugar a AGV en el rumen. La contribución de los lípidos es muy pequeña, mientras que el glicerol y galactosa surgen de la hidrólisis de lípidos. Las proteínas de los alimentos pueden ser una fuente significativa de AGV cuando la dieta presenta un contenido alto de proteína degradable en rumen. Las proteínas se hidrolizan a aminoácidos, que son desaminados antes de la conversión a AGV (France & Dijkstra, 2005).

La concentración de AGV en el rumen en un momento dado refleja un equilibrio entre la tasa de producción y la tasa de absorción. Los AGV son la principal fuente de energía absorbida por la pared digestiva del rumen (Noziere et al., 2011). Normalmente contribuyen con el 50-70% de la energía digestible del alimento (Kozloski, 2011). Inmediatamente después de la alimentación, la producción supera a la absorción y la concentración aumenta, pero posteriormente la situación se invierte y la concentración cae (France & Dijkstra, 2005). Esto varía según el tipo de alimento; cuando la alimentación es a base de concentrado, la curva es más aguda y el pico de producción ocurre a las 2 o 3 horas de la ingesta, cuando la alimentación es a base de forraje la curva de producción es menos aguda y el pico ocurre a las 4 o 5 horas luego de la ingestión (Kozloski, 2011). La concentración total de AGV puede caer tan bajo como 30 mM o llegar a valores superiores a 200 mM, pero normalmente se encuentra entre 70 y 130 mM (France & Dijkstra, 2005). Según Kozloski (2011), la concentración total de AGV en el líquido ruminal normalmente varía entre 60 mmol/L y 160 mmol/l. La concentración relativa individual de los AGV es conocida como patrón de fermentación, que es determinado por la composición de la microbiota ruminal, y que a su vez es en gran parte determinado por la dieta, en particular el tipo de carbohidratos (Dijkstra, 1994).

El equilibrio entre la producción de ácido a través de la fermentación y la secreción de sustancias tampón es la principal determinante del pH ruminal. La saliva posee bicarbonato y fosfatos que actúan como buffers y neutralizan la producción de ácido proveniente de la fermentación de MO (Allen, 1997). La sensibilidad a variaciones de pH en las bacterias ruminales es diferente. Las especies que degradan la fibra cesan su crecimiento cuando el pH ruminal disminuye a valores debajo de 6,0, mientras que las bacterias amilolíticas disminuyen su tasa de crecimiento a valores de pH próximos a 5,0 (Kozloski, 2011).

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 tampónes provenientes de la saliva, que además diluye los componentes de la alimentación más fermentables lo que reduce la producción de ácidos (Allen, 1997). Disminuciones en el pH del rumen durante períodos prolongados puede afectar negativamente el consumo, el metabolismo microbiano, y la degradación de nutrientes, y un bajo pH ruminal se relaciona con ruminitis, laminitis, diarrea y bajos valores de grasa de la leche (Enemark, 2008).

La proteína bruta contenida en los alimentos está compuesta por una fracción PDR y una fracción no PNDR (Nolan & Dobos, 2005). La degradación de las proteínas en rumen es efectuada por complejos multienzimáticos asociados a la membrana celular

bacterianas (Kozloski, 2011). Inicialmente las moléculas proteicas son hidrolizadas a oligolipeptidos hasta liberar péptidos y aminoácidos. Los aminoácidos que entran a la célula bacteriana pueden ser incorporados en proteína microbiana, durante este proceso se libera amoniaco (Berchielli et al., 2005). El amoniaco puede ser originado también por la hidrólisis de la urea que también es utilizada por las bacterias para la síntesis de proteína microbiana. La mayoría de las especies bacterianas ruminales pueden utilizar amoniaco para la síntesis de proteína microbiana, pero para aquellas especies que degradan los carbohidratos fibrosos, el amoniaco es esencial para su crecimiento (Kozloski, 2011).

Numerosos trabajos indican que el ambiente ruminal de animales que consumen pasturas templadas de alta calidad se caracteriza por valores de pH relativamente bajos, altas concentraciones de N-NH₃ y de propiónico con respecto al acético (Van Vuuren et al., 1986; Rearte & Santini, 1989; Khalili & Sairanen, 2000; Cajarville et al., 2006). A pesar de que el consumo total de MS aumentaría en animales cuya dieta incluye RTM, las condiciones del medio ruminal podrían ser más desfavorables respecto a animales con mayor proporción de pastura en la dieta. Esto sería debido a la elevado porcentaje de granos de cereales en las RTM, lo que podría generar un ambiente ruminal menos propicio para la digestión de la fibra, con menores valores de pH. Sin embargo, las RTM proveerían de mayor cantidad de sustrato energético para la microbiota ruminal. Si sumamos esto a la elevada concentración de N-NH₃ generados cuando el animal consume pasturas, la síntesis de PM y el aprovechamiento digestivo de la dieta serían favorecidos cuando se combina una RTM con sesiones de pastoreo.

En el experimento realizado por Bargo et al. (2002a), donde se evaluaron tres dietas: a) RTM, b) pastura + RTM, c) pastura + concentrado, se reportó que la concentración de NH₃ ruminal fue menor en los tratamientos RTM y pastura + RTM respecto a pastura + concentrado, aunque no se detectaron diferencias en pH (valor promedio = 5,87), concentración o perfil de AGV.

Los bajos valores de pH ruminal observados en el experimento de Bargo et al. (2002a) se encuentran por debajo del límite óptimo para la degradación de la fibra por los microorganismos y ya han sido reportados por otros autores en vacas alimentadas con pasturas templadas de alta calidad y suplementadas con concentrados (Chilibroste et al., 2005; Cajarville et al., 2006). Esto puede ser debido a que estas pasturas tienen una alta concentración de materia orgánica fermentable en rumen y un bajo contenido de fibra capaz de promover la rumia y la salivación, todo lo cual resulta en una alta producción de AGV en rumen (Kolver & de Veth, 2002). La oferta de una fuente de fibra al mismo tiempo que los alimentos concentrados, como ocurre en una RTM, minimizaría las variaciones en la tasa de producción de ácidos y por tanto del pH ruminal (Coppock et al., 1981).

En Resumen:

Las pasturas han sido y seguirán siendo la base de los sistemas de producción de leche de nuestro país y la región. Sin embargo, los sistemas de producción en base a pasturas (con o sin suplementación con concentrados y/o forrajes conservados) son altamente vulnerables a distintos factores ambientales y de manejo. En este marco, las dietas RTM podrían complementar los sistemas de producción basados en el pastoreo directo, al lograr un mayor control sobre los factores del ambiente en general, y posibilitar,

incrementar la productividad individual y por superficie. Esto sucedería a través del aumento del consumo total, la mejora del balance de nutrientes y del aprovechamiento digestivo de los alimentos consumidos a través del uso de dietas RTM permitiendo que cada vaca sea capaz de producir de acuerdo a su potencial genético. En este sentido, un uso estratégico de este tipo de dietas en determinados momentos del ciclo productivo de la vaca lechera y como complemento de una dieta que incluya pasturas, podría tener un importante impacto sobre el desempeño de los animales.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En los últimos años la producción de leche en Uruguay ha crecido a un ritmo constante y sostenido, alcanzándose en 2013 el record histórico en los litros producidos. Este crecimiento no se basó en un aumento del número de explotaciones lecheras ni de la superficie destinada a la lechería, que disminuyeron, sino en un notable aumento de la productividad (DIEA, 2013). En este sentido, se incrementó el número de vacas por unidad de superficie así como la producción por vaca. El aumento en la productividad a su vez se explica en gran medida por un cambio importante en el manejo de la alimentación. En el año 2003, la composición media de la dieta de las vacas lecheras en Uruguay suponía un consumo de 30% de concentrados y reservas y aproximadamente 70 % de forrajes pastoreados (Chilibroste et al., 2003). En el año 2010 la dieta de los tambos con mayores ingresos de capital muestra un cambio sustancial, representando el consumo de concentrados y reservas (suministrados como mezcla o en forma separada) aproximadamente un 60% de la dieta, mientras que el forraje obtenido por pastoreo directo solamente el 40% (Cajarville et al., 2012).

Este proceso de la lechería uruguaya se ha dado en forma paralela a un crecimiento de la agricultura de secano y de la forestación (DIEA, 2012). De esta forma la producción lechera ha debido sostener una fuerte competencia con estos otros rubros por el recurso suelo, lo que explica la disminución mencionada en el área lechera total. Aunque existe una fuerte competencia por la superficie, la expansión de la agricultura otorga la oportunidad a los productores lecheros de contar con granos y/o subproductos para la suplementación o elaboración de dietas concentradas para la alimentación de los rodeos. A pesar de ello, debido a la creciente demanda mundial por los granos para la alimentación humana y a la fabricación de biocombustibles, estos seguirán teniendo altos costos. Por lo cual es importante determinar qué estrategia de alimentación optimiza la eficiencia de conversión de estos alimentos a leche (Doyle et al, 2004; Beever & Doyle, 2007).

Los patrones estacionales de crecimiento y los cambios en las características nutricionales de las pasturas, son las limitaciones primarias de producir leche en base a pasturas (Doyle et al., 2001). Este desbalance entre la oferta y la demanda de nutrientes se intenta corregir con la utilización de suplementación, con reservas forrajeras y concentrados (Chilibroste et al., 2012) Los sistemas lecheros de la región utilizan dietas mixtas que combinan el pastoreo directo con el uso de concentrados y/o forrajes conservados en diferentes proporciones y suministrados separadamente. Esta forma de suministro de los concentrados, no ha demostrado que sea capaz de optimizar la potencialidad de ambos alimentos (pastura y concentrado) (Cajarville et al., 2012). Diversos trabajos han demostrado que la eficiencia de síntesis de proteína microbiana y el ambiente ruminal no se han visto favorecidos al suplementar pasturas de alta calidad

con concentrados (Aguerre et al., 2009; Aguerre et al., 2013; Tebot et al., 2012) cuando se compara con animales consumiendo solo pastura.

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 et al., 2013) Por esta razón, se ha sugerido que el suministro de una RPM como suplemento a pastoreo puede conducir a mejorar la producción de leche en comparación con los concentrados suministrados en forma separada (Beever & Doyle, 2007). Los diversos trabajos que comparan ambos sistemas de alimentación pastoril y en base a una RTM reportan una disminución en el desempeño animal explicado por la disminución en el consumo principalmente. García & Fulkerson, (2005) en una revisión bibliográfica analizando diferentes trabajos, indican que la proporción de pastura en la dieta en combinación con RTM, que lleva a una disminución menos acusada de la producción de leche, oscilaría entre un 20 a 40% del consumo total de materia seca. Según el relevamiento de Soder & Muller ,(2007) realizado en tambos de EEUU donde se evaluó las características de la alimentación de establecimientos que combinaban RTM con sesiones de pastoreo, el % que representaba la pastura en el consumo total de materia seca individual fue en promedio 25%, oscilando entre valores de 9% a 36% en los diferentes establecimientos.

En un trabajo anterior realizado por el equipo de investigación donde se estudió el efecto del tiempo de acceso a un forraje fresco en vacas alimentadas con una RTM sobre los parámetros productivos y de aprovechamiento digestivo y metabólico de vacas lecheras de alta producción, se reporta que la proporción de forraje en la dieta con la cual no se encontraron diferencias significativas con el tratamiento que consumía solo RTM fue de 11% pero sí se encontraron diferencias en consumo cuando el porcentaje de pastura en la dieta fue de 16% (Mendoza et al 2012a). Es por ello que este trabajo busca contribuir a la identificación de aquella combinación de forraje fresco y RTM que optimiza ambos alimentos en términos de aprovechamiento digestivo.

HIPÓTESIS

- En vacas alimentadas con una dieta base de tipo RTM, a mayor proporción ofertada de un FF de alta calidad se reduce el consumo total de nutrientes.
- Las vacas con mayor proporción de FF de alta calidad ofertado dedican una mayor proporción del tiempo disponible a la alimentación, en detrimento de actividades como rumia o descanso.
- A medida que aumenta la proporción ofertada de FF se producen cambios en el comportamiento y la ingesta que se reflejan en una mayor concentración de N-NH₃ y menor pH ruminal y cambios en el perfil de AGV.
- Los cambios en el comportamiento y la ingesta de FF a medida que aumenta la proporción ofertada de forraje fresco no afectarán la digestibilidad total de los nutrientes.

OBJETIVOS

Objetivo general:

Evaluar el efecto de suministrar distintas combinaciones de forraje fresco de alta calidad en una dieta base a ración completamente mezclada sobre el aprovechamiento digestivo de vacas lecheras de alta producción.

Objetivos específicos:

1. Evaluar el efecto de suministrar distintas combinaciones de un forraje fresco de alta calidad y una ración totalmente mezclada, sobre el comportamiento ingestivo, el consumo de los nutrientes y la tasa de ingestión en vacas lecheras de alta producción
2. Evaluar el efecto de suministrar distintas combinaciones de un forraje fresco de alta calidad y una ración totalmente mezclada, sobre el pH ruminal, la concentración de N-NH₃ y AGV ruminales
3. Evaluar el efecto de suministrar distintas combinaciones de un forraje fresco de alta calidad y una ración totalmente mezclada, sobre el balance de energía de vacas lecheras de alta producción.
4. Evaluar el efecto de suministrar distintas combinaciones de un forraje fresco de alta calidad y una ración totalmente mezclada, sobre la digestibilidad de los nutrientes de vacas lecheras de alta producción.

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 y heces se realizaron en el Laboratorio de Nutrición Animal de la Facultad de Veterinaria, Montevideo. El trabajo con animales fue realizado de acuerdo con los reglamentos sobre el uso de animales en experimentación, enseñanza e investigación (Comisión Honoraria de Experimentación Animal (C.H.E.A), UdelaR, Uruguay).

Diseño experimental

Se utilizaron 12 vacas multíparas Holando, seleccionadas entre las del rodeo del campo experimental, de 90 ± 22 días de lactancia, (media \pm desvío estándar (DE)) 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 3x3 por cuadruplicado, bloqueándolos en 4 cuadrados según su peso vivo, 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.

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 (0700 y 1800 h). El FF de alta calidad que fue utilizado fue Ryegrass 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. La misma fue cortada 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.

	Forraje fresco ²	RTM ³	SMPE ⁴	GHM ⁵	HS ⁶
MS ⁷ (%)	17,5 ± 5,2	38,1 ± 1,8	23,2 ± 1,5	78,4 ± 0,9	90,0 ± 0,1
<i>Composición (%MS)</i>					
MO ⁸	84,9 ± 1,2	92,7 ± 0,4	91,63 ± 0,8	98,3 ± 0,7	91,6 ± 0,2
PB ⁹	15,1 ± 2,7	18,0 ± 0,8	8,10 ± 0,1	9,5 ± 0,2	50,3 ± 1,1
FND ¹⁰	40,8 ± 4,8	41,1 ± 2,8	52,0 ± 2,1	8,5 ± 0,1	18,0 ± 0,4
FAD ¹¹	24,1 ± 2,4	24,6 ± 0,3	31,0 ± 0,9	2,2 ± 0,2	6,7 ± 0,1
CNF ¹²	26,3	31,7	29,3	79,3	21,3
EE ¹³	2,7 ± 0,2	1,9 ± 0,1	2,2 ± 0,1	4,0 ± 0,1	2,0 ± 0,1
AS ¹⁴	20,0 ± 0,7	4,2 ± 0,3			
NDIN ¹⁵	0,7 ± 0,1	0,7 ± 0,1	0,4 ± 0,0	0,4 ± 0,0	1,4 ± 0,1
NIDA ¹⁶	0,4 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,2 ± 0,0	0,3 ± 0,0	1,7 ± 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/há; 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; ¹²Carbohidratos 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 el ordeño no se les administró ningún tipo de alimento. Se ordeñaban dos veces por día (0700 y 1800 h) en el tambo y luego volvían a sus respectivos bretes donde seguían con los tratamientos asignados. La RTM se mezclaba diariamente y se ofrecía según el tratamiento, reponiendo a medida que los animales la consumían. Durante dos días consecutivos de cada periodo se determinó el peso 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 et al. (1989).

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).

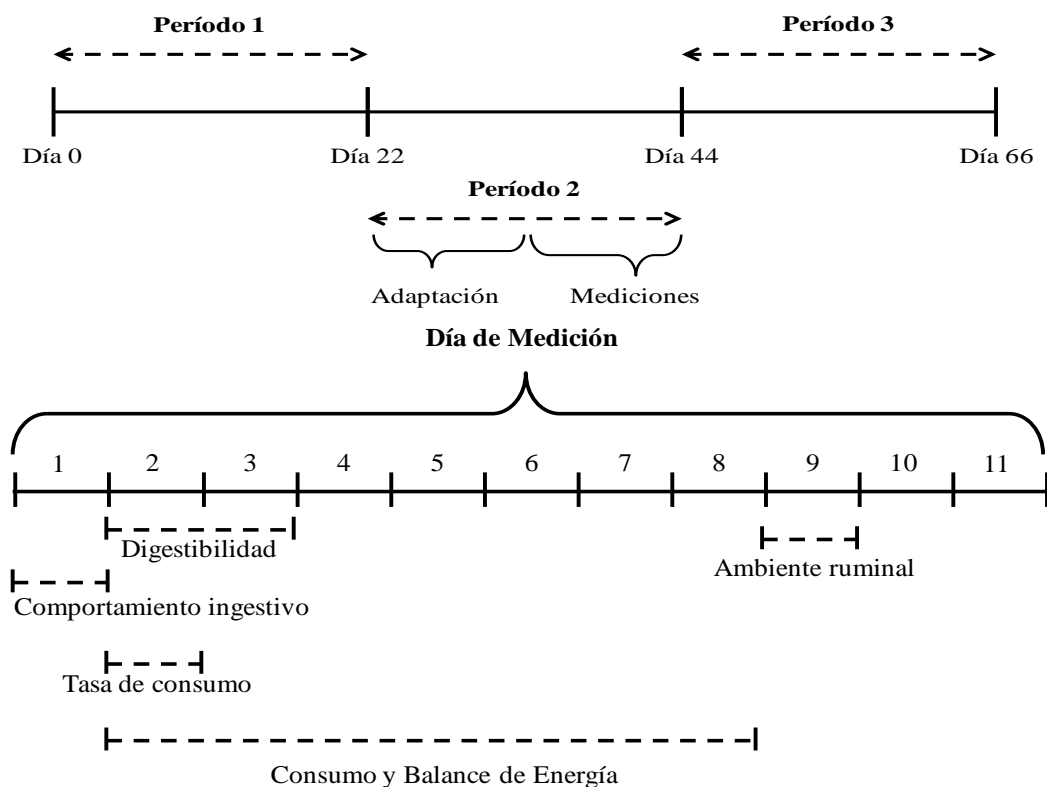


Figura 1. Esquema de determinaciones experimentales.

Mediciones y cálculos:

1. Consumo de los nutrientes

A partir del día 2 hasta el día 8 de cada período se determinó el consumo individual diario de alimentos tanto de la RTM como del forraje fresco, período por diferencia de peso entre la cantidad total de alimento ofrecido y rechazado por animal. Se tomaron muestras diarias de los alimentos ofrecidos y rechazados (cuando superó el 20 % de lo ofrecido), que se congelaron a -18°C para su posterior análisis de composición química. A partir del análisis de composición del alimento, se determinó el consumo de cada fracción de los alimentos (MS, MO, PB, FND y FDA).

2. Comportamiento ingestivo y tasa de consumo

El día 2 cada período de mediciones, el comportamiento de cada animal fue registrado cada 5 minutos durante las primeras 12 h de acceso al alimento (08:00 a 20:00 h), mediante “scan-sampling” según Hirata et al. (2002). En cada una de las observaciones, dos observadores entrenados registraron si las vacas estaban comiendo, rumiando o en otra actividad, y se clasificó según Pérez-Ruchel et al., (2014), como: “comiendo” (incluye búsqueda de alimento, prehensión y masticación ingestiva) “rumiando” (cuándo se mastica el bolo regurgitado) u “otros” (incluye las actividades que no están en las dos categorías anteriores). Este protocolo resultó en el registro de 144 observaciones por animal. Posteriormente se calculó la proporción de tiempo dedicado a cada actividad para cada hora y animal y el tiempo total dedicado a cada actividad durante las primeras 12 h de acceso al alimento. Se discriminó el tiempo (min/día) dedicado a la variable “come” para cada alimento durante las primeras 12 h de acceso al alimento.

El día 3 de cada período de mediciones, la tasa de consumo de los alimentos fue determinada para cada animal por diferencia de peso entre la cantidad de alimento ofrecido y rechazado cada hora durante las primeras 12 h luego del inicio de la ingesta. La ingesta de MS acumulada durante las 12 h en relación al inicio de la ingesta, se calculó como la suma de las cantidades de MS ingeridas en cada una de las 12 h. Se calculó la tasa de consumo para cada alimento durante las primeras 12 h de acceso al alimento.

3. 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 hs de la mañana) se colectaron muestras de líquido ruminal de 6 vacas fistulizadas en el rumen. 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, 1990). 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 et al. (1984).

4. Digestibilidad de los nutrientes

Durante los días 2 y 3 de cada período se tomaron dos muestras de heces, directamente del recto (1400 y 0200 h) para estimar producción de heces indirectamente usando fibra detergente ácido indigestible (FDAi) como marcador interno (Huhtanen et al., 1994). Estas muestras, así como de RTM y pastura se congelaron a -18°C, luego de finalizar el periodo experimental estas muestras se secaron, molieron y se incubaron en bolsas de Dacron (5 x 10 cm, poros de 50 micrones) en el rumen de 2 vacas secas con fístula en rumen, que fueron alimentadas con una dieta compuesta por 70% de heno de alfalfa y 30% de concentrado comercial. Se consideró FDAi al contenido de FDA en el residuo no digerido tras incubación *in situ* de las bolsas por 12 días consecutivos. La producción de heces se calculó de la forma descrita por Merchen (1993) como:

$$\text{kg MS de Heces/día} = \frac{\text{CFDAi (gr/día)}}{\left[\text{FDAi heces} \right] \text{ (gr/kg MS)}}$$

La digestibilidad de MS, MO, nitrógeno total, FND y FDA se determinaron a partir de los análisis de composición química, para lo cual se determinó la concentración de cenizas, nitrógeno total, FND y FDA en los alimentos y en las heces, según se describe más adelante. Los porcentajes de digestibilidad fueron calculados, para cada fracción del alimento como: (cantidad ingerida (g) - cantidad eliminada (g)) / cantidad ingerida (g).

5. Balance de energía

El balance de energía neta para lactancia (ENL) se calculó los días 2 a 8 como la diferencia entre el consumo de ENL y los requerimientos de ENL para producción de leche y mantenimiento (no se consideran de gestación, o de crecimiento, ya que se usaron vacas adultas), de acuerdo a las ecuaciones propuestas por el NRC (2001). La producción de leche de cada vaca se registró durante 7 días consecutivos (días 2 a 9), y se tomó una muestra compuesta de 4 ordeños consecutivos para determinar el contenido de grasa y proteína por análisis de infra-rojo medio (IDF, 2000).

Ecuaciones empleadas (NRC, 2001):

Requerimientos de mantenimiento (REQ MANT) = $(PV^{0,75})^{*} 0,08$ + Requerimientos caminata (REQ CAM) REQ CAM = $(\text{Distancia}/1000*2)^{*} (0,00045* PV) + (0.0012*PV)$

El contenido de energía en la leche Mcal/día se calculó de acuerdo a la fórmula siguiente (NRC, 2001): Energía excretada en leche Mcal/día (ELECHE) = $(0,0929* \% \text{grasa}) + (0,0547* \% \text{proteína}) + (0,0395* \% \text{lactosa}) * (\text{kgs de leche /día})$.

Consumo de ENL = $0,703 * \text{Energía metabolizable (EM) Mcal/kg} - 0,19$

La energía metabolizable se calculó teniendo en cuenta la composición química completa, digestibilidad de las fracciones y nivel de alimentación.

Balance de energía (Mcal/día) = Consumo de ENL – (REQ MANT + ELECHE)

6. Composición química de alimentos

Durante el período de medición de consumo y digestibilidad (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 55°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 et al., 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 AS siguiendo la técnica descrita por Yemm & 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.

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 datos de consumo, digestibilidad y balance de energía fueron analizados usando el procedimiento PROC MIXED de SAS (2002) de acuerdo al modelo lineal general que incluye como efectos fijos el tratamiento (T_k), período (P_j) y como efectos aleatorios el cuadrado (C_i), y la vaca dentro de cuadrado (Vaca(C)z):

$$Y_{ijk} = \mu + C_i + P_j + T_k + \text{Vaca(C)z} + e_{ijk}$$

Los resultados de variables con varios valores en cada período pH, N-NH₃, AGV, tasa de consumo y comportamiento se analizaron con un modelo lineal mixto, que incluyó los efectos fijos del tratamiento (T_k), período (P_j), hora de medición (H_l) (analizado como medidas repetidas) y su interacción con tratamiento ($T_k \times H_m$), y vaca como efecto aleatorio (Kaps y Lamberson, 2007) usando el procedimiento PROC MIXED de SAS (2002) según el siguiente modelo:

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

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.

RESULTADOS

Comportamiento ingestivo y tasa de consumo.

En el cuadro III se presenta la proporción de tiempo dedicado a cada actividad registrado durante las primeras 12 h de la sesión de alimentación. La proporción de animales comiendo no presentó diferencias entre tratamientos, y tampoco se observaron diferencias en la proporción de animales rumiando.

Cuadro III. Proporción de tiempo dedicado a cada actividad, tiempo dedicado a comer según alimento, tasa de consumo y tasa de consumo según alimento registrado durante las primeras 12 h pos inicio de la ingesta en vacas alimentadas con diferentes proporciones de RTM y FF (RTM100, RTM75, RTM50).

	Tratamientos ¹				P		
	RTM100	RTM75	RTM50	EEM	T ²	H	T x H
<i>Actividad (proporción del tiempo total)</i>							
Come	39,07	42,81	43,22	3,95	0,506	< 0,001	0,361
Rumia	22,74	26,46	22,76	1,99	0,304	< 0,001	0,378
Otros	38,18	30,71	34,00	3,12	0,021	< 0,001	0,389
<i>Tiempo dedicado a la variable come según alimento</i>							
Total (min)	281,33	308,25	311,25	25,87	0,253	---	---
RTM	281,33 ^a	202,42 ^b	120,08 ^c	24,54	< 0,001	---	---
Pastura	0,00	105,83 ^a	191,17 ^c	7,25	< 0,001	---	---
<i>Tasa de consumo</i>							
kg MS/h	1,85	1,93	1,66	0,18	0,114	< 0,001	< 0,001
<i>Tasa de consumo según alimentos (kg MS/h)</i>							
RTM	1,85 ^a	2,16 ^b	3,03 ^c	0,28	0,001	---	---
Pastura	0,00	1,49 ^a	1,20 ^b	0,13	< 0,001	---	---

^{a,b}Letras diferentes en un mismo renglón indican diferencias significativas, $P < 0.05$.

¹RTM 100 = 100% RTM, RTM75 = 75% RTM + 25% forraje fresco, RTM50 = 50% RTM + 50% forraje fresco. EEM: error estándar de las medias ²T= tratamiento ³H= hora ⁴TxH= interacción tratamiento x hora.

Todas las variables de actividad presentaron efecto hora ($P < 0,001$) y no presentaron interacción tratamiento por hora.

En el cuadro III se presenta el tiempo dedicado a la variable “come” registrado durante las primeras 12 h pos inicio de la ingesta y la tasa de consumo según alimento en vacas alimentadas con diferentes proporciones de RTM y forraje fresco. El valor promedio de la variable “come” fue de $300,24 \pm 28,87$ min y de la variable rumia $172,73 \pm 14,40$ min sin diferencias significativas entre tratamientos para ambas variables.

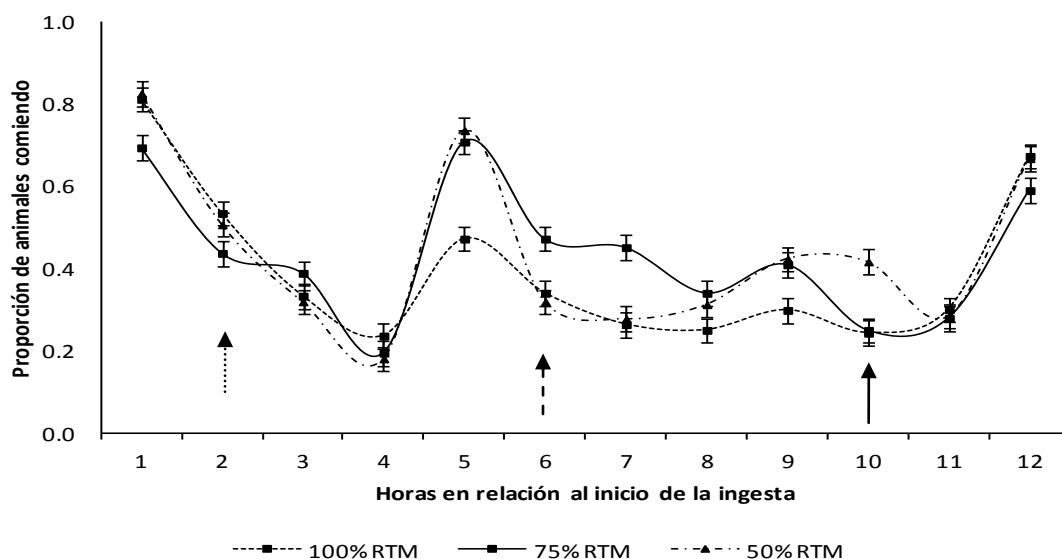


Figura 2. Proporción de animales comiendo durante las primeras 12 h pos inicio de la alimentación en vacas alimentadas con diferentes proporciones de RTM y FF (RTM100, RTM75, RTM50 respectivamente, media \pm error estándar de la media). RTM100 = 100% RTM, RTM75 = 75% RTM + 25% forraje fresco, RTM 50 = 50% RTM + 50% forraje fresco. $\cdots\cdots\rightarrow$ = RTM75 y RTM50 comienzan con ingesta de forraje fresco. $-\cdots\rightarrow$ = RTM75 retoman la ingesta de RTM. \longrightarrow = RTM50 retoman la ingesta de RTM.

En la figura 2 se observa la proporción de animales comiendo durante las primeras 12 h pos inicio de la alimentación en vacas alimentadas con diferentes proporciones de RTM y FF. No presentaron diferencias significativas entre tratamientos y tampoco interacción hora x tratamiento, pero sí efecto hora que coincide con los cambios en la alimentación durante el día de los animales como fue mencionado anteriormente. Los dos momentos en que se observa la mayor proporción de animales comiendo son a la hora 1 y a la hora 12 de iniciada la sesión de alimentación, que coincide con las dos salidas de los ordeños. A la hora 5 de iniciada la sesión de alimentación se produce un aumento en la proporción de animales comiendo para los tres tratamientos.

La tasa de consumo no presentó diferencias entre tratamientos ($P = 0,11$) alcanzando valores promedio de $1,81 \pm 0,18$ kg MS/h (Cuadro III), fue afectada por la hora ($P < 0,001$) y presentó interacción tratamiento por hora ($P < 0,001$). En la figura 3 se presenta la tasa de consumo (kg MS/h) para los distintos tratamientos. Durante la primer hora se presentó el mayor valor ($4,62 \pm 0,21$ kg MS/h), que no fue diferente entre tratamientos, pero durante la hora 2 se presentaron diferencias ($P < 0,001$) entre RTM 100 ($3,11 \pm 0,18$ kg MS/h) y RTM75 ($1,33 \pm 0,18$ kg MS/h), y se observó una tendencia entre RTM100 y RTM50 ($P = 0,06$). Durante las horas 3 a 6 no se presentaron diferencias entre tratamientos, presentando valores promedio de 1,77, 1,36, 1,90, $1,19 \pm 0,21$ kg MS/h para las horas 3, 4, 5, 6 respectivamente. Durante la hora 7 se presentaron diferencias ($P = 0,01$) entre RTM75 ($2,35 \pm 0,18$ kg MS/h) y RTM50 ($0,83 \pm 0,18$ kg MS/h). Durante las horas 8 a 12 no se presentaron diferencias entre tratamientos presentando valores promedio de 1,24, 1,20, 0,99, 1,23, $2,77 \pm 0,21$ kg MS/h para las horas 8, 9, 10, 11,12 respectivamente. Durante la hora diez de iniciada la sesión de alimentación se presentó el menor valor ($0,99 \pm 0,21$ kg MS/h) sin diferencias entre tratamientos. La tasa de consumo de RTM fue significativamente diferente para los tres

tratamientos, así como también lo fue para FF para los dos tratamientos que lo consumieron. La tasa de ingesta acumulada en las 12 horas de iniciada la sesión de alimentación tuvo una media de $22,25 \pm 1,96$ kg MS para RTM100, de $23,12 \pm 1,96$ kg MS para RTM75 y $19,54 \pm 1,96$ kg MS para RTM50. Estos resultados no presentaron diferencias significativas entre tratamientos pero sí existió una tendencia ($P = 0,085$) donde RTM75 tendió a ser mayor que RTM50.

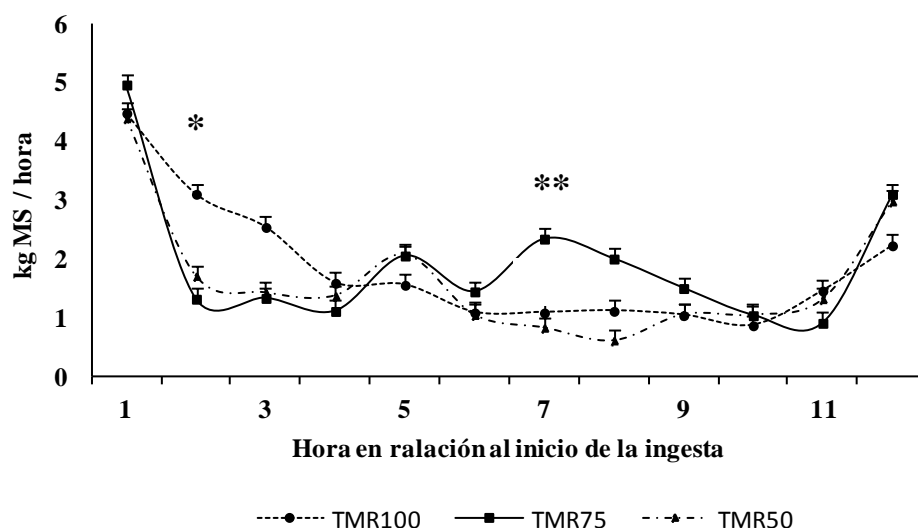


Figura 3. Tasa de consumo (kg MS/h) durante las primeras 12 h pos inicio de la alimentación en vacas alimentadas con diferentes proporciones de RTM y FF (RTM100, RTM75, RTM50 respectivamente, media \pm error estándar de la media). RTM100 = 100% RTM, RTM75 = 75% RTM + 25% forraje fresco, RTM50 = 50% RTM + 50% forraje fresco.

* La interacción tratamiento por hora fue significativa ($P < 0,001$) para la hora 2 entre RTM100 y RTM75.

** La interacción tratamiento por hora fue significativa ($P = 0,01$) para la hora 7 entre RTM75 y RTM50.

Consumo de los nutrientes

En el Cuadro IV se presenta el consumo de los nutrientes de la dieta para los distintos tratamientos. El consumo de MO (kg/día) fue significativamente menor para el tratamiento RTM50 con respecto a RTM100 y RTM75 ($P = 0,001$). El consumo de FND y FAD (kg/día) fue significativamente menor para el tratamiento RTM50 con respecto a RTM100 ($P = 0,03$ y $P = 0,02$ respectivamente). Cuando se calculó como % del PV el consumo de FND fue significativamente menor para el tratamiento RTM 50 con respecto a RTM75 y RTM100 ($P = 0,03$). Los porcentajes de FND en relación a la dieta total no fueron diferentes significativamente, presentando valores promedio de $41,08 \pm 1,88$ %.

Cuadro IV. Consumo diario de las distintas fracciones del alimento en vacas alimentadas con diferentes proporciones de RTM y FF (RTM100, RTM75, RTM50).

	Tratamientos			EEM	P
	RTM100	RTM75	RTM50		T
Consumo MO (kg/día)	23,03 ^a	22,39 ^a	20,38 ^b	0,78	0,001
RTM (kg/día)	23,03 ^a	16,47 ^b	11,24 ^c	0,77	<0,001
Forraje fresco (kg/día)	0	5,92 ^a	9,14 ^b	0,26	<0,001
Consumo total FND (kg/día)	10,17 ^a	10,10 ^{ab}	9,43 ^b	1,81	0,030
RTM (kg/día)	10,17 ^a	7,25 ^b	5,01 ^c	0,48	<0,001
Forraje fresco (kg/día)	0	2,85 ^a	4,42 ^b	0,25	<0,001
Total % PV	1,80 ^a	1,79 ^a	1,61 ^b	0,09	0,030
Consumo de PB (kg/día)	4,48 ^a	4,22 ^a	3,76 ^b	0,25	<0,001
RTM (kg/día)	4,48 ^a	3,16 ^b	2,17 ^c	0,18	<0,001
Forraje fresco (kg/día)	0	1,05 ^a	1,59 ^b	0,09	<0,001
Consumo de CNF (kg/día)	7,87 ^{xa}	7,40 ^{ya}	6,66 ^b	0,28	<0,001
RTM (kg/día)	7,87 ^a	5,56 ^b	3,83 ^c	0,26	<0,001
Forraje fresco (kg/día)	0	1,84 ^a	2,83 ^b	0,10	<0,001
Dieta total					
RTM:FF	100:0 ^a	71:29 ^b	53:47 ^c	1,11	<0,001
% PB	18,01 ^a	17,17 ^b	16,60 ^c	0,82	<0,001
% FND	41,12	41,10	41,03	1,88	0,931
ENL Mcal/kg	1,70 ^a	1,64 ^b	1,60 ^c	0,002	<0,001

^{a,b} Letras diferentes en un mismo renglón indican diferencias significativas, $P < 0,05$
¹RTM100 = 100% RTM, RTM75 = 75%RTM + 25% forraje fresco, RTM50 = 50% RTM + 50% forraje fresco. EEM: error estándar de las medias T= tratamiento. P= efecto del tratamiento.

El consumo de PB fue significativamente menor para RTM50 con respecto a RTM100 ($P < 0,001$). Los porcentajes de PB en relación a la dieta total fueron significativamente diferentes para los tres tratamientos ($P < 0,001$) presentando el mayor porcentaje RTM 100. La ENL Mcal/kg de MS fue significativamente diferente para los tres tratamientos ($P < 0,001$). El consumo de CNF kg/día fue significativamente menor para RTM50 con respecto a RTM100 y RTM75 ($P < 0,001$), y se observó una tendencia entre RTM100 y RTM75 ($P = 0,07$).

Balance de Energía

En la cuadro V se presenta el balance de energía en vacas alimentadas con diferentes proporciones de RTM y FF. El consumo total de ENL (Mcal/día) no presentó diferencias entre el tratamiento RTM100 y RTM75 ($41,2 \pm 1,56$ Mcal/día) pero fue menor para RTM50 ($36,5 \pm 1,56$ Mcal/día, $P < 0,001$). La energía excretada en leche fue menor para RTM50 ($20,9 \pm 0,91$ Mcal/día, $P = 0,001$) y no presentó diferencias entre RTM100 y RTM75 ($23 \pm 0,91$ Mcal/día). El balance de energía fue positivo para los tres tratamientos, y fue mayor para RTM100 respecto a RTM50 ($P = 0,008$), mientras que RTM75 no difirió de ambos.

Cuadro V. Balance de Energía en vacas alimentadas con diferentes proporciones de RTM y forraje fresco (RTM100, RTM75, RTM50).

	Tratamientos ¹				P ²
	RTM100	RTM75	RTM50	EEM	T
Consumo total ENL (Mcal/día)	42,20 ^a	40,20 ^a	36,48 ^b	1,56	<0,001
RTM	42,20 ^a	29,86 ^b	20,55 ^c	1,41	<0,001
Forraje fresco	0	10,34 ^a	15,93 ^b	0,56	<0,001
Energía excretada en leche (Mcal/día)	23,07 ^a	22,76 ^a	20,92 ^b	0,91	0,001
Balance de Energía (Mcal/día)	8,91 ^a	7,22 ^{ab}	5,37 ^b	1,27	0,008

^{a,b} Letras diferentes en un mismo renglón indican diferencias significativas, $P < 0.05$.

¹RTM100 = 100% RTM, RTM75 = 75%RTM + 25% forraje fresco, RTM50 = 50% RTM + 50% forraje fresco. EEM: error estándar de las medias²T= tratamiento.

Digestibilidad de los nutrientes

En el Cuadro VI se presentan los % de digestibilidad de los nutrientes para los distintos tratamientos. Para MO no se detectaron diferencias significativas en la digestibilidad, presentando valores promedio de 77,9%. Para las fracciones PB y FAD no se detectaron diferencias significativas en la digestibilidad, presentando valores promedio de 65,8 y, 78,9% respectivamente. El % de digestibilidad de la FND presentó una tendencia ($P = 0,07$) siendo RTM100 el tratamiento que presentó el mayor valor

Cuadro VI. Digestibilidad aparente de las distintas fracciones del alimento en vacas alimentadas con diferentes proporciones de RTM y FF (RTM100, RTM75, RTM50).

	Tratamientos ¹			EEM	P ²
	RTM100	RTM75	RTM50		T
Excreción Fecal (kg MS/día)	5,54 ^a	5,42 ^a	4,99 ^b	0,25	0,010
Digestibilidad (%)					
MO	77,21	77,99	78,49	0,62	0,366
FND	71,43 ^x	68,50 ^y	69,68 ^{xy}	1,11	0,079
FAD	66,75	66,68	64,14	4,28	0,442
PB	79,74	79,52	77,55	2,02	0,142

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

^{x,y} Letras diferentes en un mismo renglón indican tendencia, $P > 0,05$ y $P < 0,10$.

¹RTM100 = 100% RTM, RTM75 = 75%RTM + 25% forraje fresco, RTM50 = 50% RTM + 50% forraje fresco. EEM: error estándar de las medias ²T= tratamiento.

Ambiente ruminal

El valor medio de pH no varió entre los tres tratamientos (6,06) (Cuadro VII). El pH ruminal fue afectado por la hora de muestreo ($P < 0,001$) y presentó interacción tratamiento por hora ($P = 0,01$). Mientras que el pH ruminal de los animales RTM100 no varió a lo largo del día, en los animales del tratamiento RTM75 y RTM50 disminuyó después del comienzo de la alimentación con FF (Figura 4). El pH presentó un valor máximo de 6,26 a la hora 1 luego de iniciada la sesión de alimentación y un valor mínimo de 5,77 a la hora 12, ambos valores para el tratamiento RTM50, presentando valores intermedios para el tratamiento RTM100 y RTM75.

La concentración media de N-NH₃ en rumen fue menor para el tratamiento RTM50 con respecto a RTM75 y RTM100 ($P < 0,01$) (Cuadro VII). La concentración de N-NH₃ en rumen fue afectada por la hora de muestreo ($P < 0,001$) y no presentó interacción tratamiento por hora. 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.

La concentración total de AGV (mmol/L) no varió entre los tres tratamientos ($117,8 \pm 8,78$) (Cuadro VII). 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 VII). 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.

Cuadro VII. 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				P ²		
	RTM100	RTM75	RTM50	EEM	T	T x H	H
pH	6,09	6,04	6,06	0,04	0,453	0,014	<0,001
N-NH₃ (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
Propionico%	32,37 ^a	28,56 ^b	27,20 ^b	1,44	<0,001	0,838	0,041
Butirico %	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

La proporción molar de acético no varió entre los tres tratamientos (media $57,9 \pm 2,90$ %) ni tampoco fue afectada por la hora ni presentó interacción tratamiento por hora. La proporción molar de propiónico fue afectada por los tratamientos ($P < 0,001$) siendo el tratamiento RTM100 el que presentó mayor proporción ($32,4 \pm 1,44\%$) con respecto a RTM75 ($28,6 \pm 1,44\%$) y a RTM50 ($27,2 \pm 1,44\%$) (Cuadro VII). La proporción molar de propiónico no presentó interacción significativa tratamiento por hora y se vio afectada por la hora ($P = 0,04$). La proporción molar 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 ($13,9 \pm 1,61\%$) (Cuadro VII). La proporción molar de butírico no presentó interacción tratamiento por hora ($P > 0,10$) y se vio afectada por la hora ($P < 0,001$).

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 entre el tratamiento y la h 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.

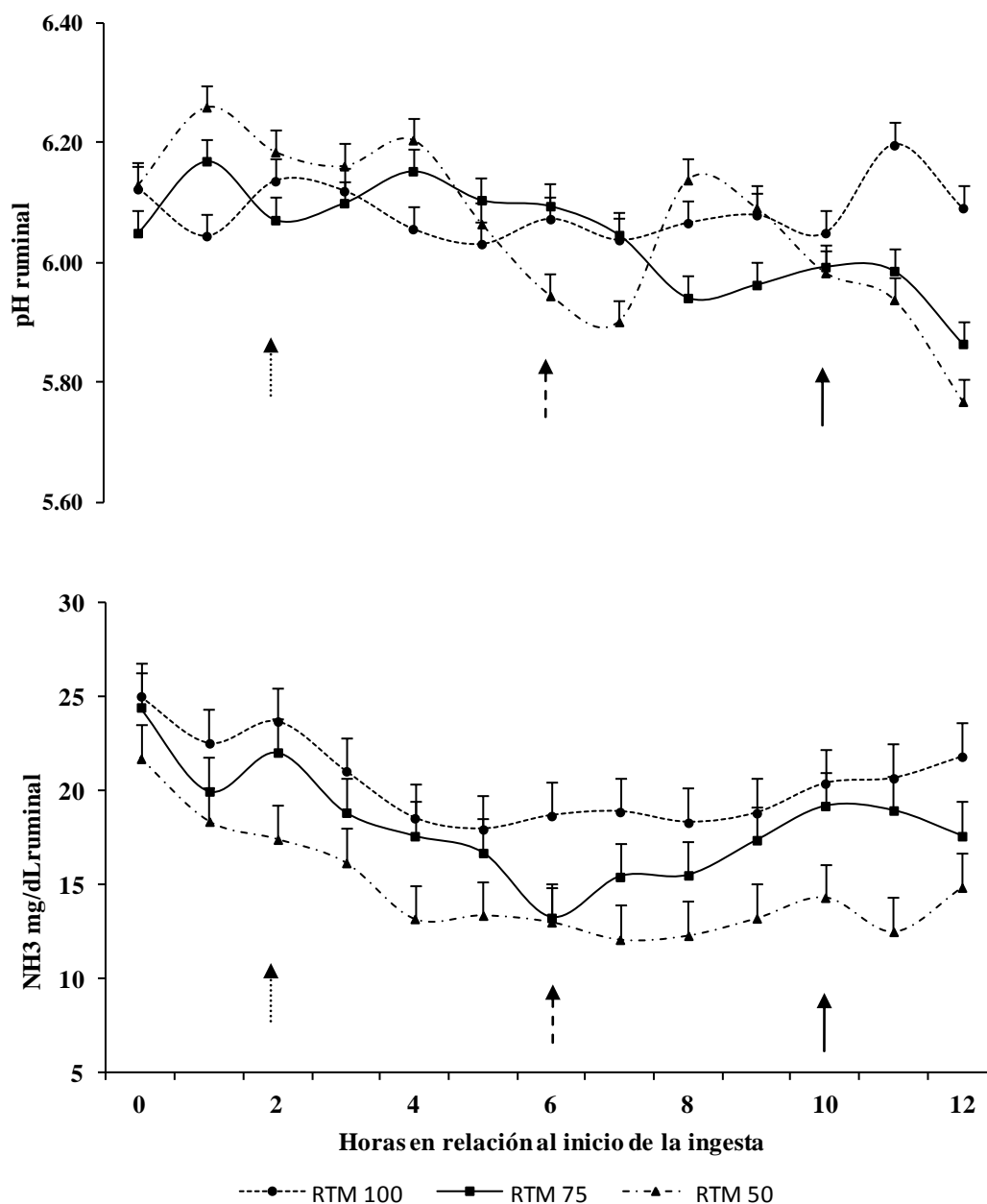


Figura 4. Dinámica de pH y de N-NH₃ (mg/dL) ruminal en vacas alimentadas con forraje alimentadas con diferentes proporciones de RTM y FF (RTM 100, RTM 75, RTM 50 respectivamente, media ± error estándar de la media). La hora 0 indica el momento de inicio de la ingesta. El eje de las ordenadas para el pH comienza en 5,6 y el eje de las ordenadas de N-NH₃ comienza en 5.▶ = RTM75 y RTM50 comienzan con ingesta de forraje fresco. ---▶ = RTM75 retoman la ingesta de RTM. —▶ = RTM50 retoman la ingesta de RTM.

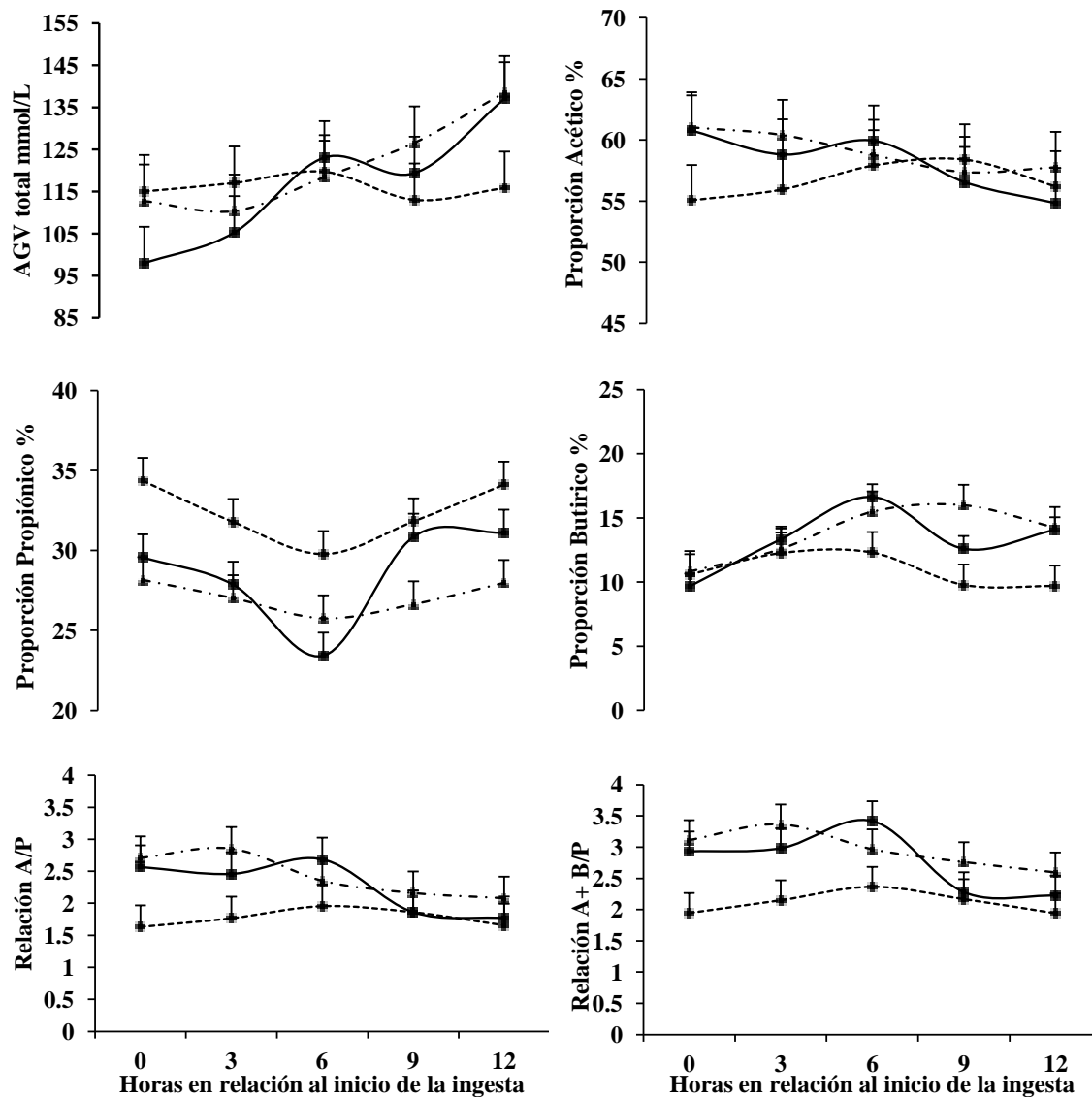


Figura 5. Dinámica de concentración total de AGV (mmol/L), proporción molar de acético, propiónico, butírico (%), relación A+B/P, y relación A/P en rumen de vacas alimentadas con forraje alimentadas con diferentes proporciones de RTM y FF (RTM100, RTM75, RTM50 respectivamente, media \pm error estándar 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.

DISCUSIÓN

La RTM suministrada a los animales presentó valores de composición química considerados como no limitantes para el óptimo desempeño de los animales y fue formulada según los requerimientos para vacas lecheras de 600 kg de peso vivo, con 90 días de lactación y para producir 35 L con 4 % de grasa por día según NRC, (2001). El % de MS final de la RTM fue un poco inferior ($38\% \pm 1,8$) al estimado inicialmente debido a que ensilaje de maíz planta entera presentó un menor valor de MS de lo esperado ($23\% \pm 1,5$). Los niveles de PB estuvieron por debajo del rango esperado para este tipo de pasturas para la época del año en que fue realizado el experimento lo que probablemente sea debido a la ausencia de fertilización de la pastura desde su implantación.

En todos los tratamientos los niveles de fibra determinados y fibra efectiva calculados estuvieron por encima de las recomendaciones mínimas para bovinos de estas características según NRC, (2001). Por su parte los contenidos de CNF sugieren una buena disponibilidad de carbohidratos de fácil fermentación en rumen en todas las dietas. Los niveles de PB en % de la dieta total en todos los tratamientos, también estuvieron acordes con los reportados como necesarios para vacas lecheras de alta producción. Cunningham et al. (1996), Leonardi et al. (2003), y Broderick (2003) no observaron ningún efecto sobre la producción de leche y proteína de vacas lecheras, cuando la PB de la dieta aumentó de 16,5 a 18,5%. Esto coincide con los datos reportados por el NRC, (2001) y por Ipharraguerre & Clark (2005), quienes sugieren que la producción de proteína microbiana no mejoró y tampoco hubo un aumento en la producción de leche por aumentar el contenido de PB en la dieta por encima del 16,5%. También coincide con lo reportado por Olmos-Colmenero & Broderick (2006), quienes concluyen que alimentar a vacas lecheras con un 16.5% de PB en la dieta parece ser adecuado para promover una óptima síntesis microbiana en rumen y maximizar su flujo hacia el duodeno.

Los valores finales en % de proteína bruta para los tres tratamientos reflejan un adecuado consumo de PB kg/día, así como de proteína degradable en rumen esto se vio reflejado en los niveles de N-NH₃ ruminal presentados para los tres tratamientos, siendo el valor más bajo de N-NH₃ en rumen de $14,99 \pm 1,89$ mg/dl, mayor al valor umbral (8 mg/dL) por debajo del cual se comprometería la síntesis de proteína microbiana (Van Soest et al., 1994). El consumo de PB kg/día de este trabajo, coinciden con los valores reportados por Bargo et al, (2002b) para RTM100 y RTM75 no así para RTM50 que presentó el menor valor ($3,77 \pm 0,25$ kg/día) debido al menor % de PB presente en el FF utilizado ($15,03 \pm 2,7$) con respecto a la RTM ($18,01 \pm 0,8$). Además de la diferencia observada en el % de PB de la dieta total para RTM50 con respecto a RTM100 y RTM75, dado por el menor % de PB presente en el forraje fresco, mencionada anteriormente, la diferencia encontrada en el consumo de PB kg/día también está dada por la diferencia en el consumo de materia seca total reportado para los tres tratamientos de este experimento presentando el menor consumo RTM50 22,86 kg de MS/día, RTM75 24,56 kg de MS/día y RTM 100 24,83 kg de MS/día sin diferencias entre RTM75 y RTM100 (Pastorini et al., 2014).

Es importante destacar que si bien en este trabajo no fue medida la ingesta de proteína indegradable, se realizó la estimación a través de NRC, (2001), de la relación teórica ingerida de proteína degradable/ proteína indegradable (RDP/RUP) para los tres

tratamientos, siendo para RTM100 de 2745/1629 g/día, para RTM75 de 2770/1489 g/día y para RTM50 de 2631/1155 g/día. Esta estimación teórica reflejaría que no hubo una limitación de aporte de RUP para animales lecheros de alta producción según NRC (2001).

La proporción final de RTM y pastura consumida por los animales fue 53:47 para RTM 50, 71:29 para RTM75 y 100:0 para RTM100. El consumo de MO kg/día fue menor para el tratamiento RTM50 que para RTM75 y RTM100, esto era esperable y es debido al mayor contenido de MO en la RTM en comparación con el forraje utilizado (92,68 % para la RTM y 84,91% para el FF). Este resultado coincide con lo reportado por Kolver & Muller (1998) y Bargo, et al (2002b) en donde los tratamientos RTM en comparación con los tratamientos que consumían pastura tuvieron el mayor consumo de MO. Kolver & Muller (1998) indican que las vacas que consumieron pastura, consumieron 19% menos de materia orgánica (MO) en comparación con las que consumieron RTM. Este menor consumo de MO también está asociado al menor consumo de MS registrado para este trabajo mencionado anteriormente (Pastorini et al., 2014).

El consumo de FND kg/día fue mayor para RTM100 y RTM75 con respecto a RTM50. Este mayor consumo de FND kg/día es debido al mayor consumo total de MS para RTM100 y RTM75 (Pastorini et al., 2014), con respecto a RTM50 ya que el % de FND de la dieta total de los tres tratamientos no presentó diferencias significativas coincidiendo con lo reportado por Kolver & Muller (1998), quienes no encontraron diferencias significativas en el consumo de FND expresado como % de la dieta total. Los valores de consumo total de FND en kg/día encontrados en este trabajo son mayores a los reportados por Bargo et al. (2002b) y Kolver & Muller (1998). Este consumo de FND en términos de % PV representó para el tratamiento RTM100 y RTM75 un 1,8%, siendo este mayor con respecto a RTM50. Estos niveles de consumo de FND no habrían limitado la ingestión total de MS posiblemente debido a la elevada digestibilidad de la fracción fibrosa, la cual presentó valores promedio de 69,83% para los tres tratamientos sin diferencias significativas entre RTM100 y RTM50, aunque presentando una tendencia entre RTM 100 y RTM75. La digestibilidad de la FND es un importante parámetro de la calidad del forraje (Oba & Allen, 1999), y en este trabajo la digestibilidad de la FND presentó altos valores promedio lo que indica buena calidad de los alimentos utilizados. Adicionalmente, son de destacar los altos niveles de digestibilidad observados en este experimento para los diferentes nutrientes, los cuales superaron el 70 % para la MS, MO y PB, y coinciden con lo reportado por otros integrantes de nuestro equipo de trabajo (Aguerre et al., 2009; Santana, 2012 y Félix, 2013 en vaquillonas, Tebot et al., 2012 en ovinos), todos trabajando con forrajes templados de buena calidad. Según Van Soest (1994), la digestibilidad aparente de la dieta es resultado de la combinación de 2 factores, el tránsito digestivo y la tasa de digestión. Si bien no son reportados aún los datos de tasa de pasaje en este trabajo, es esperable que haya cambios en la tasa de pasaje de la MO, esto podría explicar la falta de efecto sobre la digestibilidad de la MO.

Observando los resultados se podría afirmar que el consumo de FND kg/día no fue la limitante en el consumo total de MS al comparar los tres tratamientos, Se ha reportado que la digestibilidad y el contenido de FND del forraje son dos factores que limitan el consumo de rumiantes alimentados con pasturas (Forbes, 2007). Sin embargo, los valores de digestibilidad del forraje observados en el presente trabajo fueron altos, por lo que la digestibilidad no sería un factor limitante del consumo así como tampoco los

niveles de ingestión de FND como % del PV. Van Soest (1994) demostró que la relación entre contenido de FND del forraje y consumo fue lineal aún incluyendo forrajes con digestibilidades mayores a 85%, y concluyó que los animales consumen hasta completar una cierta capacidad de almacenar FND en el rumen y una vez que el pool de FND ha sido reducido a través de los procesos de degradación y pasaje, el animal está en condiciones de volver a consumir. Sin embargo, esta teoría de regulación física del consumo presentaría limitaciones para explicar los niveles de ingestión voluntaria observados en animales consumiendo forrajes de alto valor nutritivo y bajo contenido de MS. Algunos autores han sugerido que en estas condiciones los factores que controlan el consumo en la sesión inicial de pastoreo podrían ser otros como ser la alta concentración en rumen de los productos de la fermentación (Chilibroste et al., 2007) y/o el bajo contenido de MS de las pasturas (Cabrera et al., 2004). Sin embargo la concentración de AGV total máxima en este trabajo se produjo a la hora 12 de iniciada la ingesta y la concentración de N-NH₃ máxima si se produjo en la hora 0 de iniciada la sesión de alimentación. Por tal motivo, no sería esperable que los productos de la fermentación hayan sido una causa de disminución de la tasa de consumo a partir de la primera hora del inicio de la alimentación en nuestro trabajo y las diferencias encontradas en el consumo de materia seca entre los tres tratamientos, sin embargo, el alto contenido de agua del forraje utilizado podría haber sido la causa de las diferencias en el consumo de materia seca entre los tres tratamientos.

El consumo de CNF kg/día fue significativamente menor para RTM50 en comparación con RTM100 y RTM75 lo cual era esperable debido al mayor aporte de CNF de la RTM en comparación con el FF, además de la diferencia observada en la composición química de las dietas suministradas, el mayor consumo de materia seca total observado para RTM100 y RTM75 en comparación con RTM50 es la causa de la diferencia observada en el consumo de CNF kg/día.

El consumo total de ENL (Mcal/día) no presentó diferencias entre el tratamiento RTM100 y RTM75 ($41,2 \pm 1,56$ Mcal/día) pero fue menor para RTM50 ($36,5 \pm 1,56$ Mcal/día) coincidiendo con lo reportado por Bargo et al., (2002) para vacas lecheras consumiendo dietas similares. Este menor consumo de ENL (Mcal/día) para RTM50 es explicado principalmente por el menor consumo de MO para este tratamiento, por la menor ENL Mcal/kg MS de la dieta total que consumió el tratamiento RTM50 y el menor consumo de materia seca total para RTM50 como se mencionó anteriormente. Este resultado coincide con lo reportado por Kolver & Muller (1998), Bargo et al. (2002a) y Muya et al. (2011), quienes reportaron disminuciones entre 19% y 25% en el consumo de ENL en vacas consumiendo dietas con una elevada proporción de pasturas respecto a vacas consumiendo dietas RTM.

El Balance de energía (Mcal/día) fue positivo para los tres tratamientos y el mayor balance de energía observado en RTM100 respecto a RTM50 sería explicado por el mayor consumo de ENL (Mcal/día) y el mayor consumo de materia seca total observado para RTM100 y RTM75 en comparación con RTM50 (Pastorini et al., 2014). Schroeder et al. (2005) reportan un balance energético positivo para animales consumiendo RTM y negativo para animales consumiendo una dieta básicamente pastoril, similar a lo observado en el presente trabajo, donde el tratamiento con menor balance de energía fue el tratamiento RTM50, siendo este el que más FF consumió. Si bien la longitud de los períodos experimentales permite sacar conclusiones limitadas respecto a PV y CC, igualmente estas variables fueron determinadas a los efectos de

complementar la información obtenida. El análisis de las mismas sugiere que hubo una variación de PV y de la CC en forma positiva sin diferencias significativas entre tratamientos.

La proporción total de tiempo destinado a la actividad “come” no varió entre tratamientos, tampoco el tiempo total destinado a rumiar. Esto coincide con lo reportado por Mendoza et al (2012a). En pastoreo la suma del tiempo destinado a pastorear y rumiar es cercano al 70 % del día para vacas lecheras (Stockdale & King, 1984). Si bien en este experimento los alimentos, tanto la pastura como la RTM fueron suministrados en comederos, la proporción de tiempo destinado para la actividad “come” más la actividad “rumia” coincide con lo reportado por Stockdale & King (1984) observado durante las doce horas luego de iniciada la sesión de alimentación.

El comportamiento ingestivo es naturalmente cíclico y el estudio del consumo de alimentos diario individual de los animales muestra una considerable variación en el día a día (Forbes & Provenza, 2000). Según Gibb et al. (1997), para vacas lecheras se distinguen 3 o 4 sesiones importantes en pastoreo, ubicándose al comienzo y al final del día, manteniéndose este comportamiento a pesar de la influencia en el cambio del patrón natural por los ordeñes. Este patrón de comportamiento ingestivo fue observado en este trabajo a pesar de las condiciones diferentes en que fue realizado, observándose 2 sesiones claras de alimentación a las salidas de los ordeñes, coincidiendo con el patrón natural que describe Gibb et al. (1997), para animales lecheros en pastoreo. También se observa una tercer sesión de alimentación hacia las horas del mediodía, coincidiendo con lo reportado por Gibb et al. (1997). En las primeras horas de iniciada la sesión de alimentación se produce un aumento de la proporción de tiempo dedicado a alimentación en detrimento de actividades como rumia y descanso, lo que coincide con lo reportado por Gregorini et al. (2009).

La tasa de consumo no presentó diferencias entre los tres tratamientos, presentado valores promedio de $1,81 \pm 0,18$ kg MS/h que coinciden con los reportados por Mattiauda et al. (2013) quienes reportan valores de 1,7 a 2,0 kg MS/h y con los reportados por Mendoza et al. (2012a). Durante la primera hora de acceso al alimento se observó la mayor tasa de consumo sin diferencias entre tratamientos, sufriendo variaciones a lo largo del día determinadas por las asignaciones de alimentos. La mayor tasa de consumo observada en los animales en la primera hora no se mantuvo después de la primera hora del comienzo de la alimentación. Para RTM100 si bien también cae la tasa de consumo para la hora 2 y 3 mantiene niveles mayores que los tratamientos RTM75 y RTM50 observándose menores variaciones a lo largo del día en la tasa de consumo kg MS /h. Esta mayor inestabilidad para RTM75 y RTM50 con respecto a RTM100, coincide con aumentos en la tasa de consumo en los momentos de cambio de alimentos lo que indica que el cambio generaría estímulos positivos. El cambio de dieta de pastura a RTM y de RTM a pastura causó un cambio en el comportamiento de las vacas, las cuales dejaron de realizar otras actividades para dedicarse a comer, y esto se ve reflejado en el aumento en la tasa de consumo. Este concepto es explicado por Forbes & Provenza (2000) quienes indican que el acceso a un solo alimento induce al aburrimiento de los animales y a una reducción en el consumo, seguido por el hambre y el aumento de la ingesta, por lo que el patrón cíclico de ingesta se manifiesta.

Cuando se desagrega la variable “come” en función de los alimentos, se observa que el tratamiento RTM50 destinó un tiempo mayor para consumir similares kg de MS de FF

(10,7 vs 12,1 kg MS) en comparación con el tiempo destinado a consumir similares kg de MS de RTM (191 min vs 120 min), esto indica que la RTM fue consumida a una mayor tasa que el FF (3,03 vs 1,2 kg MS/h). Esto coincide con el concepto manejado por Kolver & Muller (1998), indicando que cuando los animales son alimentados con una RTM tienen la posibilidad de aumentar la tasa de consumo y reducir el tiempo de masticación. Este hecho podría ser explicado por las diferencias en contenido de MS al comparar la RTM y el forraje fresco utilizado. Como fue observado por Cabrera Estrada et al. (2004) la tasa de consumo en vacas lecheras es mayor a mayor contenido de MS en el alimento. A pesar de que no se encontraron diferencias entre los tres tratamientos en el valor promedio de la tasa de consumo (kg MS/h) la diferencia observada en la tasa de consumo para los diferentes alimentos podría indicar que la diferencia en el contenido de MS de los alimentos llevo a una menor tasa de consumo y esta fue la causa del menor consumo de MS reportado para este experimento (Pastorini et al., 2014).

Si bien no fue medida la tasa de consumo en horas de la noche, al comparar la tasa de ingesta acumulada en las primeras 12 horas de acceso al alimento (kg MS) con el consumo de MS total, se observa que la ingesta de alimentos en la noche fue muy pequeña, presentando un promedio \pm error estándar de $2,45 \pm 1,48$ kg MS para los tres tratamientos, sin diferencias significativas entre ellos.

Es sabido que el pH ruminal es consecuencia del balance entre la concentración de ácidos y los sistemas tampón propios (búferes salivales) o exógenos (aditivos dietarios); en este sentido, el nivel de FND proveniente de forrajes en todas las dietas estuvo por encima de los recomendados para asegurar un correcto estímulo para la rumia y la salivación (NRC, 2001). Existe una relación positiva entre el porcentaje de FND proveniente de forraje y el pH ruminal, debido a 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). Los valores de pH ruminal 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. A pesar de las diferencias en el consumo de CNF kg/día observadas, la causa de no haber encontrado diferencias en el pH ruminal probablemente sea el % de FND logrado para los tres tratamientos, no presentando diferencias entre ellos. En el presente trabajo, los animales parecen haber consumido hasta lograr un consumo constante de FND como % de la dieta total, presentando diferencias en el consumo de FND kg/día determinado por las diferencias en consumo total de materia seca, como se mencionó anteriormente. Tampoco se encontraron diferencias en la concentración total de AGV (mmol/L) entre los tres tratamientos.

Bargo et al. (2002a) reporta menores valores que a los reportados en este trabajo, al comparar animales consumiendo RTM, RTM parcial y pastura + concentrado, quienes reportan valores promedio de $5,87 \pm 0,04$. Estos valores de pH medidos en este trabajo son menores que los reportados por Mendoza et al, (2012c), quienes reportan valores de $6,49 \pm 0,10$ para vacas lecheras consumiendo RTM, RTM + 4 horas de pastura y RTM + 8 horas de pastura. El tratamiento RTM100 presentó un pH más estable a lo largo del día, con menores oscilaciones, en cambio RTM75 y RTM50 presentaron mayores cambios a lo largo del día, asociados a los cambios en la alimentación, registrándose los menores valores de pH en los momentos posteriores al suministro del forraje fresco que

coinciden con momentos de mayor concentración de AGV (mmol/L). Esto puede ser debido a que estas pasturas tienen una alta concentración de materia orgánica fermentable en rumen y un bajo contenido de fibra capaz de promover la rumia y la salivación, todo lo cual resulta en una alta producción de AGV en rumen (Kolver & Veth, 2002). Aunque en el presente trabajo los % FND consumida por los tres tratamientos no presentaron diferencias significativas, probablemente las menores oscilaciones observadas en el pH para RTM100 podrían estar relacionadas con la estabilidad del consumo de RTM para RTM100.

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 France & Dijkstra (2005), la concentración total de AGV puede oscilar entre valores de 30 y 200 mmol/ aunque los valores normales oscilan entre 70 y 130 mmol/L. Según Kozloski (2011), la concentración total de AGV en el líquido ruminal normalmente varía entre 60 mmol/L y 160 mmol/l. Es importante considerar que los valores de concentración, no necesariamente reflejan la cantidad absorbida. Los valores reportados para este experimento son menores que los reportados por Bargo et al. (2002) para vacas lecheras consumiendo RTM, RTM parcial y pastura más concentrado; estos autores tampoco reportaron diferencias entre tratamientos respecto a esta variable.

La concentración individual de los tres principales AGV mmol/l no varió entre tratamientos, presentando valores promedio de $67,7 \pm 6,09$, $34,7 \pm 2,92$, $15,3 \pm 2,37$ para acético, propiónico y butírico respectivamente, estos valores pueden ser considerados en base a la literatura valores medios y esperables para animales en estas condiciones. Es sabido que el acetato y el butirato absorbidos son usados principalmente como fuente de energía directa por cualquier tejido, o como sustrato para la lipogénesis, mientras que el propionato es ampliamente usado para la gluconeogénesis (France & Dijkstra, 2005). La proporción individual de acético no varió entre tratamientos presentando un valor promedio de $57,9 \pm 2,90$ %. Esto coincide con lo reportado por Bargo et al, (2002), quienes no encontraron diferencias en la proporción individual de acético al comparar animales consumiendo RTM, RTM parcial y pastura + concentrado, aunque dichos autores reportan un valor mayor para la proporción de acético $63,06 \pm 1,42$ %. Una fermentación ruminal con mayor proporción de ácido acético tendería a mantener un pH más estable y a incrementar los precursores de la grasa láctea.

En cuanto a la proporción individual de propiónico, en el presente trabajo se observó una variación entre tratamientos, presentando una mayor proporción para el tratamiento RTM100 ($32,4 \pm 1,44$) con respecto a RTM75 y RTM50, ($28,6 \pm 1,44$) y ($27,2 \pm 1,44$) respectivamente, esto es debido al mayor aporte de sustratos precursores principalmente el almidón presente en la dieta que se le suministro al tratamiento RTM100. La tendencia a la fermentación ruminal más propiónica aumenta la síntesis de glucosa y lactosa y por tanto el volumen de producción de leche. Estos valores de ácido propiónico observados en este trabajo son mayores a los reportados por Bargo et al, (2002) quienes no encontraron diferencias en la proporción de propiónico al comparar animales consumiendo RTM, RTM parcial y pastura más concentrado. Al ser el propionato el principal precursor hepático de la glucosa, esto debería verse reflejado en la glicemia. Este hecho fue medido para este experimento y no reportado en este trabajo,

observándose una mayor glicemia para RTM100 y RTM75 con respecto a RTM50 (Pastorini et al., 2013)

En cuanto a la proporción individual de butírico en el presente trabajo se observó una variación entre tratamientos presentando los mayores valores los tratamientos que presentaron consumo de forraje fresco RTM75 ($13,3 \pm 1,61$) y RTM50 ($13,9 \pm 1,61$) vs RTM100 ($10,9 \pm 1,61$). Esta variación en la proporción de ácido butírico se podría adjudicar a la mayor proporción de azúcares solubles encontrada en la pastura respecto a la RTM ($20 \pm 0,7$ vs $4,2 \pm 0,3$). Los valores de proporción de ácido butírico coinciden con los reportados por Bargo et al. (2002a) al comparar animales consumiendo RTM, RTM parcial y pastura + concentrado, quienes reportan valores promedio de $12,04 \pm 0,94\%$. Este patrón de fermentación ruminal podría limitar la síntesis y producción de leche y es usualmente observado en sistemas pastoriles. El aumento de la proporción de butirato en detrimento del propionato disminuiría la producción de leche y de lactosa, y aumentaría la producción de grasa en la leche (Miettinen & Huhtanen, 1996).

La relación A/P fue estadísticamente menor para RTM100 con respecto a RTM75 y RTM50 principalmente por la mayor proporción propionato presente en RTM100 $p < 0,05$, debido a que la proporción de acético no presentó diferencias entre tratamientos. Las causas de esta alteración en el perfil de AGV estarían determinadas por la variación en la proporción de carbohidratos estructurales y no estructurales (almidón) que se da en la dieta al incluir los concentrados presentes en la RTM y al aumentar la proporción de RTM en la dieta total. La relación A+B/ P fue menor para RTM100 con respecto a RTM75 y RTM50 debido a la mayor proporción de propionato y a la menor proporción de butirato encontrado para RTM100. Esta relación que favorece los precursores glucogénicos en relación a los lipogénicos aumentaría el flujo de glucosa al hígado y a la glándula mamaria, la producción de lactosa y por tanto la producción de leche (Miettinen & Huhtanen, 1996).

La concentración media de N-NH₃ mg/ dl en rumen fue menor para el tratamiento RTM 50 con respecto a RTM75 y RTM100. Los valores observados siempre estuvieron por encima de los reportados como mínimos para optimizar la digestión y el crecimiento microbiano en rumen (Clark et al., 1992). Este resultado no coincide con lo reportado por Bargo et al. (2002), quienes indican que al comparar animales consumiendo RTM, RTM parcial y pastura + concentrado el tratamiento con mayores concentraciones de N-NH₃ ruminal es el de mayor proporción de forraje en la dieta. Los resultados de este trabajo coinciden con lo reportado por Mendoza et al, (2012c) 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. Estas mayores concentraciones ruminales de N-NH₃ mg/dl son explicadas por el mayor consumo de PB kg/día para los tratamientos RTM100 y RTM75 con respecto a RTM50. También fue menor el % de PB de la dieta total para RTM50 con respecto a RTM100 y RTM75, dado por el menor % de PB presente en el forraje fresco utilizado esto limitaría la cantidad de proteína disponible en rumen que puede ser degradada a N-NH₃ y/o con posibles diferencias a nivel de degradabilidad ruminal del N de la pastura que se tradujeran en menor cantidad de N disponible a nivel de rumen. Si bien en este trabajo no fue medida la degradabilidad ruminal, la digestibilidad de la PB no presentó diferencias entre tratamientos pero presentaron niveles elevados, lo cual concuerda con alimentos muy degradables a nivel ruminal.

Se ha observado en numerosos trabajos que la concentración de nitrógeno ureico tanto en plasma como en leche guarda una estrecha correlación positiva con la ingesta de nitrógeno en vacas lecheras (Kohn, 2007). Esto es debido a que se genera una mayor concentración en el rumen de $N-NH_3$ luego de la degradación microbiana de la proteína y que éste atraviesa rápidamente las paredes ruminales hacia la sangre, esta mayor disponibilidad de aminoácidos a nivel hepático genera excedentes de grupos aminos que son finalmente utilizados en la síntesis de urea. Los niveles de urea en leche y urea en sangre medidos durante este ensayo experimental pero no reportados en este trabajo fueron mayores para los tratamientos RTM100 y RTM75 con respecto a RTM50; esto es diferente a lo que se esperaba a priori, dado que es esperable que a mayor proporción de pastura en la dieta sea mayor el consumo de PB dado por los mayores niveles de PB característico en estas pasturas y por tanto mayores los niveles de $N-NH_3$ ruminal, urea en sangre y en leche. Esto no ocurrió debido a las diferencias existentes en el consumo de PB mencionadas anteriormente a favor de los tratamientos que tenían mayores proporciones de RTM.

CONCLUSIONES

Los resultados de esta tesis realizado en estas condiciones experimentales, permiten concluir que es posible combinar pastura fresca hasta en un 30% de la dieta total (en base seca) con una RTM sin deprimir el consumo total de nutrientes. Por encima de este nivel, el consumo de nutrientes disminuyó, lo que se vio reflejado en un balance menos positivo de energía. Esta disminución estuvo asociada a una reducción en la tasa de consumo cuando los animales tenían acceso al forraje fresco, pero no a cambios en la proporción de tiempo destinado a alimentarse.

Las diferentes combinaciones de pastura fresca y RTM no afectaron la digestión de la materia seca y tuvieron efectos moderados sobre la fermentación ruminal, con una disminución de la concentración ruminal de amoníaco en la dieta a mayor ingesta de forraje fresco, y una mayor proporción relativa de ácido propiónico para los animales que consumieron exclusivamente RTM, y una mayor proporción relativa de ácido butírico para los animales que consumieron mayor cantidad de forraje fresco.

IMPLICANCIAS

En las condiciones experimentales planteadas en este trabajo, si el consumo cae a partir de un 30% de inclusión de forraje fresco en una dieta base de RTM y la digestibilidad de los nutrientes no cambió, ello supone que a partir de este 30% de inclusión de forraje fresco se reduce la cantidad de nutrientes disponibles para la síntesis de leche y sus precursores. Es importante tener en cuenta este hecho para una adecuada formulación de la dieta cuando se combina RTM con forraje fresco, también es de destacar que sería interesante estudiar a futuro si estos resultados se repetirían con otros tipos de forrajes.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. A.O.A.C., (1984). Official methods of analysis. 14th Ed. Association of Official Agricultural Chemists. Arlington. 1102 p.
2. A.O.A.C., (1995). Association of Official Analytical Chemist. Official Methods of analysis. 16th ed. AOAC, Arlington VA.
3. Adams, R. F., Jones, R. L., Conway, P. L., (1984). High performance liquid chromatography of microbial acid metabolites. J Chromatogr. 336:127.
4. Aguerre, M., Cajarville, C., Machado, V., Persak, G., Brambillasca, S., Repetto, J.L. (2009). Dry matter intake and digestibility of temperate pastures supplemented with sorghum grain in wethers and heifers. S. Afr. J. Anim. Sci. 39 (Suppl. 1), p: 251-255.
5. Aguerre, M., Cajarville, C., Kozloski, G.V., Repetto, J.L. (2013). Intake and digestive responses by ruminants fed fresh temperate pasture supplemented with increased levels of sorghum grain: A comparison between cattle and sheep. Anim. Feed Sci. Technol 186: 12– 19.
6. Allden, W.G., Whittaker, I.A., (1970). The determinants of herbage intake by grazing sheep: the interrelationship of factors influencing herbage intake and availability. Aust. J. Agric. Res. 21:755-766.
7. 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.
8. Alvarez, M.J., Santini, F.J., Rearte, D.H., Elizalde, J.C. (2001). Milk production and ruminal digestion in lactating dairy cows grazing temperate pastures and supplemented with dry cracked corn or high moisture corn. Anim. Feed Sci. Technol. 91:183-195.
9. Antúnez, M., Caramelli, A. (2009). Variación en la composición química y producción de gas *in vitro* de pasturas de acuerdo al horario de corte. Tesis de Grado, Facultad de Veterinaria. UdelaR. 43p.
10. Auldist, M.J., Marett, L.C., Greenwood, J.S., Hannah, M., Jacobs, J.L., Wales, W.J. (2013). Effects of different strategies for feeding supplements on milk production responses in cows grazing a restricted pasture allowance. J. Dairy Sci. 96:1218–1231.
11. Bargo, F., Muller, L.D., Varga, G.A., Delahoy, J.E., Cassidy, T.W. (2002a). Ruminal 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.
12. Bargo, F, Muller, L.D., Delahoy, J.E., Cassidy, T.W. (2002b). Performance of high producing dairy cows with three different feeding systems combining pasture and total mixed rations. J Dairy Sci 85: 2948–2963.
13. Bargo, F., Muller, L.D., Delahoy, J.E., Cassidy, T.W. (2002c). Milk response to concentrate supplementation of high producing dairy cows grazing at two pasture allowances. J. Dairy Sci. 85:1777–1792
14. Bargo, F., Muller, L.D., Kolver, E.S., Delahoy, J.E. (2003). Invited Review: Production and digestion of supplemented dairy cows on pasture. J. Dairy Sci. 86:1–42.
15. 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.
16. Berchielli, T.T., Vaz Pires, A., de Oliveira, S.G. (2005). Nutrição de Ruminantes. Ed FUNEP. Jaboticabal, São Paulo. 616p.

17. 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.
18. Cabrera Estrada, J.I., Delagarde, R., Faverdin, P., Peyraud, J.L (2004). Dry matter intake and eating rate of grass by dairy cows is restricted by internal, but not external water. *Anim Feed Sci Technol.* 114: 59–74
19. Cajarville, C., Aguerre, M, Repetto, J.L. (2006). Ruminal pH, N-NH₃ concentration and forage degradation kinetics on cows grazing temperate pastures and supplemented with different sources of grain. *Anim Res:* 55: 1-11.
20. 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.
21. Chaudry, A.S. (2008). Forage based animal production systems and sustainability, an invited keynote. *R. Bras. Zootec.* 37 (Supl. E.): 78-84
22. Charlton, G.L., Rutter, S.M., East, M., Sinclair, L.A. (2011). Effects of providing total mixed rations indoors and on pasture on the behavior of lactating dairy cattle and their preference to be indoors or on pasture. *J. Dairy Sci* 94: 3875-3884.
23. Chilbroste, P., Ibarra, D., Zibil, S., Laborde, D. (2003). Proyecto alimentación Reproducción CONAPROLE 2002. Informe final. CONAPROLE. 28 p.
24. Chilbroste, P., Gibb, M., Tamminga, S. (2005). Pasture characteristics and animal performance. In: *Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism*, 2nd edition (Eds: J. Dijkstra, J. Forbes and J. France). CAB International. Wallingford, UK. pp: 681-706.
25. Chilbroste P, Soca P, Mattiauda DA, Bentancur O, Robinson PH. (2007). Short term fasting as a tool to design effective grazing strategies for lactating dairy cattle: a review. *Aust. J. Exp. Agric.* 47:1075-1084
26. Chilbroste, 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.
27. Clark, J.H., Klusmeyer, T.H., Cameron, M.R. (1992). Microbial protein synthesis and flows of nitrogen fractions to the duodenum of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 75:2304-2323.
28. Cohen, D. C. (2001). Degradability of crude protein from clover herbages used in irrigated dairy production systems in northern Victoria. *Aust. J. Agric. Res.* 52, 415–425.
29. Coppock, C.E., Bath, D.L., Harris, B. (1981). From feeding to feeding systems. *J Dairy Sci* 64: 1230-1249.
30. Cunningham, K. D., Cecava, M. J., Johnson, T. R., Ludden, P. A. (1996). Influence of source and amount of dietary protein on milk yield by cows in early lactation. *J. Dairy Sci.* 79:620–630
31. Diario Oficial. (2000). Ordenanza sobre Uso de Animales en Experimentación, Docencia e Investigación. Dirección Nacional de Impresiones y Publicaciones Oficiales, Montevideo. Uruguay. N° 25.467. 1440-C a 1444-C, pp: 64-68.
32. DIEA. (2012). Anuario estadístico agropecuario 2012. Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca, Dirección de Estadísticas Agropecuarias, Uruguay. Disponible en:
<http://www.mgap.gub.uy/portal/hgxpp001.aspx?7,5,659,O,S,0,MNU;E:27;8;MNU;?> (fecha de consulta: 10/3/2013).
33. Dijkstra, J. (1994) Production and absorption of volatile fatty acids in the rumen. *Livest Prod. Sci.* 39: 61–69.

34. Dillon, P. (2006). Achieving high dry-matter intake from pasture with grazing dairy cows. In: Fresh herbage for dairy cattle (Eds: Elgersma A, Tamminga S). Springer. Dordrecht, The Netherlands. pp: 1-26.
35. Dixon, R. M., Stockdale, C.R. (1999). Associative effects between forages and grains: consequences for feed utilization. *Aust. J. Agric. Res.* 50:757-773.
36. Doyle, P.T., Stockdale, C.R., Wales, W.J., Walker G.P., Heard J.W. (2001) Limits to and optimising of milk production and composition from pastures. *Recent. Adv in Anim. Nut. Aust.* 13: 9 -17
37. Doreau, M., Michalet-Doreau, B., Bechet, G. (2004). Effect of underfeeding on digestion in cows. Interaction with rumen degradable N supply. *Livest. Prod. Sci.* 88:33-41.
38. 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
39. Enemark, J.M.D. (2008). The monitoring, prevention and treatment of sub-acute ruminal acidosis (SARA): A review. *Vet. J.* 176:32-43
40. Fajardo, M., Mattiauda, D.A., Meikle, A., Carriquiry, M., Gil, J., Motta, G., Guala, G., Ortega, G., Pelaez, D., Sorhouet, P., Souza, F., Chilbroste, P. (2012). Performance of Holstein dairy cows under different feeding strategies in early lactation. *J. Anim. Sci.* Vol. 90, (Suppl. 3): 367.
41. Félix, A. (2013) Restricción en el tiempo de acceso al forraje fresco: Efecto sobre el consumo, el comportamiento, el aprovechamiento digestivo y algunos indicadores del metabolismo energético y proteico en terneras de carne. Tesis de Maestría en Nutrición de Rumiantes. Montevideo, Uruguay. 89 p
42. France, J., Dijkstra, J. (2005) Volatile Fatty Acid production. In: Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism, 2nd edition (Eds: J. Dijkstra, J. Forbes and J. France). CAB International. Wallingford, UK. pp: 157-175.
43. Fontaneli, R., Sollenberger, L., Littell, R., Staples, C.R. (2005). Performance of lactating dairy cows managed on pasture-based or in freestall barn-feeding systems. *J Dairy Sci* 88: 1264-1276.
44. Forbes, J.M. (2007). Integrative theories of food intake control. En: Forbes JM. (2007). Voluntary food intake and diet selection in farm animals. 2a Ed. CAB International Publishing. Wallingford, RU, Cap 9, pp: 188-203.
45. Forbes, J.M. (2003). The multifactorial nature of food intake control. *J. Anim. Sci.* 81(E. Suppl. 2):E139-E144.
46. Forbes, J.M., Provenza, F.D. (2000). Integration of learning and metabolic signals into a theory of dietary choice and food intake In: Ruminant Physiology. Digestion, Metabolism, Growth and Reproduction (Ed Cronjé, P.B.) CAB International Wallingford, UK. pp: 3-21.
47. Galli, J.R., Cangiano, C.A., Fernández, H.H. (1996). Comportamiento ingestivo y consumo de bovinos en pastoreo. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 16:119-142.
48. Garcia, S.C., Fulkerson, W.J. (2005). Opportunities for future Australian dairy systems a review. *Aust. J. Exp. Agric.* 45: 1041-1055.
49. Gehman, M.A., Bertrand, J.A., Jenkins, T.C., Pinkerton, B.W. (2006) The effect of carbohydrate source on nitrogen capture in dairy cows on pasture. *J. Dairy Sci* 89:2659 -2667.
50. Gibb, M. (2006). Grassland management with emphasis on grazing behaviour in Fresh Herbage for Dairy Cattle A. Elgersma, J. Dijkstra, S. Tamminga. (eds.), Springer, Netherlands pp 141-157.
51. Gill, M. (1979). The principles and practice of feeding ruminants on complete diets. *Grass For Sci* 34: 155-161.

52. Gregorini, P., Clark, C.E.F., Jago, J.G., Glassey, C.B., McLeod, K.L.M., Romera A.J. (2009). Restricting time at pasture: effects on dairy cow herbage intake, foraging behavior, hunger-related hormones, and metabolite concentration during the first grazing session. *J. Dairy Sci.* 92:4572-4580.
53. Hirata, M., Iwamoto, T., Otozu, W., Kiyota, D. (2002). The effects of recording interval on the estimation of grazing behavior of cattle in a daytime grazing system. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* 15:745-750.
54. Hoekstra, N.J., Schulte, R.P.O., Struik, P.C., Lantinga, E.A. (2007). Pathways to improving the N efficiency of grazing bovines. *Eur. J. Agron.* 26: 363-374.
55. Huhtanen, P., Kaustell, K., Jaakkola, S. (1994). The use of internal markers to predict total digestibility and duodenal flow of nutrients in cattle given six different diets. *Anim Feed Sci Technol* 48: 211-227.
56. Ipharraguerre, I. R., Clark, J. H. (2005). Impacts of the source and amount of crude protein on the intestinal supply of nitrogen fractions and performance of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 88(E Suppl.): E22-E37.
57. Kaps, M., Lamberson, W.R. (2007). *Biostatistics for animal science*. CABI Publishing. Wallingford, UK. 445 p.
58. Khalili, H., Sairanen, A. (2000). Effect of concentrate type on rumen fermentation and milk production of cows at pasture. *Anim. Feed Sci. Technol.* 84: 199.
59. Kohn, R. (2007). Use of Milk or Blood Urea Nitrogen to Identify Feed Management Inefficiencies and Estimate Nitrogen Excretion by Dairy Cattle and Other Animals. In: *Proceedings of the Florida Ruminant Nutrition Symposium*. Gainesville, USA. pp: 1-15.
60. Kolver, E.S. (2003). Nutritional limitations to increased production on pasture-based systems. *Proc Nut Soc* 62: 291-300.
61. 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.
62. Kolver, E.S., de Veth, M.J. (2002). Prediction of ruminal pH from pasture-based diets. *J Dairy Sci* 85: 1255-1266.
63. Kozloski, G.V. (2011). *Bioquímica dos ruminantes*. 3ª edição. UFSM. Santa Maria. RS. 212 p.
64. Leonardi, C., Stevenson, M. Armentano. L. E. (2003). Effect of two levels of crude protein and methionine supplementation on performance of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 86:4033-4042
65. 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.
66. Loor, J.J., Soriano, F.D., Lin, X., Herbein, J.H., Polan. C.E. (2003). Grazing allowance after the morning or afternoon milking for lactating cows fed a total mixed ration (TMR) enhances trans11-18:1 and cis9,trans11-18:2 (rumenic acid) in milk fat to different extents. *Anim. Feed Sci. Technol.* 109: 105-119
67. Mattiauda DA, Tamminga S, Gibb MJ, Soca P, Bentancur O, Chilibroste P. (2013). Restricting access time at pasture and time of grazing allocation for Holstein dairy cows: ingestive behaviour, dry matter intake and milk production. *Livest. Sci.* 152:53-62.
68. Mendoza, A., Cajarville C., Colla, R., Gaudentti, G., Martín, M.E., Repetto, J.L., (2012a). Dry matter intake and behavior patterns of dairy cows fed diets combining pasture and total mixed ration. *J. Dairy Sci.*, 95 (Supl 2): 716

69. Mendoza, A., Cajarville, C., de la Quintana, E., Garmendia, M.E., Mutuberría, E., de Torres, E, Repetto, J.L. (2012b). Milk yield and composition of dairy cows fed diets combining pasture and total mixed ration. *J. Dairy Sci.*, 95 (Suppl 2): 249
70. Mendoza, A., Cajarville, C., Amaral. V., Pirotto. E., Puig, M., Repetto, JL., (2012c). Concentración de Nitrógeno amoniacal y pH ruminal en vacas lecheras alimentadas con forraje fresco y ración totalmente mezcladas. *Veterinaria (Montevideo)* 48 (Suppl 1): 150
71. Merchen, N.R. (1993). Digestion, absorption and excretion in ruminants. In: *The Ruminant Animal. Digestive Physiology and Nutrition* (Ed: Church DC), Waveland Press. Prospect Heights, Illinois, USA. pp. 172-201.
72. Mertens, D.R (1996) Methods in modelling feeding behaviour and intake in herbivores. *Ann Zootech* 45, suppl, 153-164.
73. Miettinen, H., Huhtanen, P. (1996). Effects of the Ratio of Ruminal Propionate to Butyrate on Milk Yield and Blood Metabolites in Dairy Cows. *J Dairy Sci* 79:851-861.
74. 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.
75. Muya, M.C, Nherera, F.V, Khekana, T. Ramapuptla, T. (2011). Lactation performance of multiparous Holstein cows fed a restricted total mixed ration plus legume and grass hay mixture. *J. Anim Vet. Adv.* 10 (14) 1779-1784.
76. Nápoli, G.M., Santini, F.J. (1988a) Suplementación energético-proteica de forrajes frescos en condiciones de pastoreo: I. Efecto sobre el medio ambiente ruminal y la degradabilidad proteica. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 8 (1):39
77. Nápoli, G.M., Santini F.J. (1988b) Suplementación energético-proteica de forrajes frescos en condiciones de pastoreo: II. Efecto sobre la digestión ruminal de la fibra. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 8 (1):40
78. Nocek, J.E., Russell, J.B., (1988). Protein and energy as an integrated system. Relationship of ruminal protein and carbohydrate availability to microbial protein synthesis and milk production. *J. Dairy Sci.* 71: 2070–2107.
79. Nolan, J.V., Dobos, R.C. (2005). Nitrogen Transactions in Ruminants. In: *Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism*, 2nd edition (Eds: J. Dijkstra, J. Forbes and J. France). CAB International. Wallingford, UK. pp: 177-206.
80. Noziere, P. Glasser, F. Sauvant, D. (2011). In vivo production and molar percentages of volatile fatty acids in the rumen: a quantitative review by an empirical approach. *Animal* 5:3; 403–414
81. National Research Council. (2001). *Nutrient requirements of dairy cattle*. 7th revised edition. National Academy Press. Washington D.C., USA. 381 p.
82. Nielsen, S.S. (Ed.), (2003). *Food analysis laboratory manual*. Kluwer Academic/Plenum Publisher, Nueva York.
83. Oba, M. Allen, M. S. (1999). Evaluation of the importance of the digestibility of neutral detergent fiber from forage: effects on dry matter intake and milk yield of dairy cows *J Dairy Sci* 82:589–596.
84. Olmos, G., Boyle, L., Hanlon, A., Patton, J., Murphy, J.J., Mee, J.F. (2009). Hoof disorders, locomotion ability and lying times of cubicle-housed compared to pasture-based dairy cows *Livest. Sci.* 125:199-207

85. Olmos Colmenero, J. J., Broderick, G. A. (2006). Effect of Dietary Crude Protein Concentration on Ruminal Nitrogen Metabolism in Lactating Dairy Cows. *J. Dairy Sci.* 89:1694–1703
86. O'Neill, B.F., Deighton, M.H., O'Loughlin, B.M., Mulligan, F.J., Boland, T.M., O'Donovan, M., Lewis, E. (2011). Effects of a perennial ryegrass diet or total mixed ration diet offered to spring-calving Holstein-Friesian dairy cows on methane emissions, dry matter intake, and milk production. *J. Dairy Sci.* 94:1941–1951.
87. Pastorini M, Pomiés N, Cajarville C, Mendoza A, Borges Y, Cruz I, Otegui P, Oyarvide V, Repetto JL. (2013). Variación de la concentración plasmática de insulina y glucosa en vacas lecheras alimentadas con ración totalmente mezclada y pastura de alta calidad. IX Congreso Nacional de Veterinaria. Uruguay
88. 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.
89. Perez-Ruchel, A. Repetto, J. L. Cajarville, C. (2014). Use of NaHCO₃ and MgO as additives for sheep fed only pasture for a restricted period of time per day: effects on intake, digestion and the rumen environment. *Journal of Animal Physiology & Animal Nutrition*. En prensa.
90. 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. Disertación de Tesis de Magister en Nutrición de Rumiantes. Facultad de Veterinaria, Universidad de la República. Uruguay. 100 p.
91. Pérez-Ruchel, A. (2006). pH, Amoníaco, Ácidos Grasos Volátiles y Producción de Proteína Microbiana en el Rumen de Corderos, según el Horario de Corte de la Pastura Consumida. Tesis de Grado, Facultad de Veterinaria. UdelaR. 36p.
92. Rearte, D.H, Santini, F.J. (1989). Digestión ruminal y producción en animales a pastoreo. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 9:93-105.
93. Repetto, J.L., Aguerre, M., Alonso, M., Curbelo, A., Errandonea, N., Cajarville, C., (2001). Concentración de amoníaco ruminal en vacas a pastoreo, suplementadas con distintos granos. VII Congreso Nacional de Veterinaria. Montevideo, noviembre 2001.
94. Repetto, J.L., Cajarville, C., D'alessandro, J., Curbelo, A., Soto, C., Garín, D. (2005) Effect of wilting and ensiling on ruminal degradability of temperate grass and legume mixtures. *Anim. Res.* 54:73-80.
95. 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.
96. Rushen, J., de Passillé, A.M., von Keyserlingk, M.A.G., Weary, D.M. (2008). Housing for adult cattle. In: *The welfare of cattle*. Springer. Amsterdam, Netherlands. pp 142-180.
97. Santana, A., Ubilla, J., Berrutti, M., Konrath, T., Aguerre, M., Britos, A., Cajarville, C., Repetto, J.L., (2011). Dry matter intake, ruminal pH and fermentation capacity of rumen fluid in heifers fed temperate pasture, total mixed rations or both. *J Anim Sci* 89 (1): 511.
98. Santana, A. (2012). Inclusión de pastura templada en una dieta completa totalmente mezclada para bovinos: Efectos sobre el consumo, el ecosistema ruminal y el

- aprovechamiento digestivo y metabólico de los nutrientes. Tesis de Maestría en Nutrición de Rumiantes. Montevideo, Uruguay. 45 p.
99. SAS. 2002. Statistical Analysis Systems Institute. SAS Version 9. SAS.
 100. Schroeder, G.F., Couderc, J.J., Bargo, F., Rearte, D.H. (2005). Milk production and fatty acid profile of milk fat by dairy cows fed a winter oats (*Avena sativa* L.) pasture only or a total mixed ration. *New Zeal J Agric Res* 48: 187–195.
 101. Soder, K.J., Muller, L.D. (2007). Case study: Use of Partial Total Mixed Rations on Pasture-Based Dairy Farms in Pennsylvania and New York. *Prof. Anim. Sci* 23:300–307.
 102. Soriano, F.D, Polan, C.E, Miller, C.N. (2001). Supplementing pasture to lactating Holsteins fed a total mixed ration diet. *J Dairy Sci* 84: 2460–2468.
 103. Sprunck, M., Mattiauda, D., Motta, G., Fajardo, M., Chilibroste, P. (2012). Response of postpartum dairy cows to contrasting feeding strategies: Grazing plus supplements versus confinement on milk and solids production. *J. Dairy Sci.* 95 (Suppl. 2): 486.
 104. Tebot, I., Cajarville, C., Repetto, J.L., Cirio, A. (2012). Supplementation with non-fibrous carbohydrates reduced fiber digestibility and did not improve microbial protein synthesis in sheep fed fresh forage of two nutritive values. *Anim.* 6:617-623.
 105. Tucker, W.B., Rude, B.J., Wittayakun, S. (2001). Case study: Performance and economics of dairy cows fed a corn silage-based total mixed ration or grazing annual ryegrass during mid to late lactation. *Prof Anim Sci* 17: 195-201.
 106. Van Soest, P.J. (1994). Nutritional ecology of the ruminant. Ithaca, N.Y. Cornell University Press.
 107. Van Soest, P.J., Robertson, J.B., Lewis, B.A. (1991). Symposium: Carbohydrate Methodology, metabolism, and nutritional implications in dairy cattle. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74 3583-3597.
 108. Van Vuuren, A.M., van der Koelen, C.J., Vroons de Bruin, J. (1986). Influence of level and composition of concentrate supplements on rumen fermentation patterns of grazing cows. *Neth. J. Agric. Sci.* 34:457-467.
 109. Van Vuuren, A.M., Van Den Pol-Van Dasselaar. (2006). Grazing systems and feed supplementation in Fresh Herbage for Dairy Cattle A. Elgersma, J. Dijkstra S. Tamminga (eds.), Springer, Netherlands pp 85-101.
 110. Wales, W.J., Marret, L.C., Greenwood, J. S., Wright, M.M., Thornhill, J.B., Jacobs, J.L., Ho.C.K.M., Auldist, M.J. (2013). Use of partial mixed rations in pasture based dairying in temperature regions of Australia. *Anim. Prod. Sci.* 53:1167-1178
 111. Washburn, S.P., White, S.L., Green, Jr J.T., Benson, G.A. (2002). Reproduction, Mastitis, and Body Condition of Seasonally Calved Holstein and Jersey Cows in Confinement or Pasture Systems *J. Dairy Sci.* 85 105–111.
 112. Vázquez, O. P., Smith, T. R. (2000). Factors Affecting Pasture Intake and Total Dry Matter Intake in Grazing Dairy Cows. *J Dairy Sci* 83:2301–2309
 113. Vibart, R.E., Fellner, V., Burns, J.C., Huntington, J.B., Green, J.T. (2008). Performance of lactating dairy cows fed varying levels of total mixed ration and pasture. *J Dairy Res* 75: 471–480.
 114. Yemm, E.W., Willis, A.J., (1954). The estimation of carbohydrates in plant extract by anthrone. *Biochem J* 57:508.