



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

FRECUENCIA DIARIA DE SUPLEMENTACIÓN EN BOVINOS

**Efectos Sobre el Aprovechamiento Digestivo y Metabólico de la
Dieta, la Actividad Fermentativa y el Ambiente Ruminal**

GERMÁN ANTÚNEZ TORT

TESIS DE MAESTRÍA EN NUTRICIÓN DE RUMIANTES

**URUGUAY
2015**



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

FRECUENCIA DIARIA DE SUPLEMENTACIÓN EN BOVINOS

**Efectos Sobre el Aprovechamiento Digestivo y Metabólico de la
Dieta, la Actividad Fermentativa y el Ambiente Ruminal**

GERMÁN ANTÚNEZ TORT

**José Luis Repetto, DCTV. PhD
Director de Tesis**

**Cecilia Cajarville, DCTV. PhD
Co-director de tesis**

2015

INTEGRACIÓN DEL TRIBUNAL DE

DEFENSA DE TESIS

**Georget Elizabeth Banhero; Med. Vet., PhD.,
Programa Nacional de Carne y Lana- Instituto Nacional de
Investigación Agropecuaria- INIA la Estanzuela- Uruguay**

**Virginia Beretta; Ing. Agr., MSc., PhD.,
Departamento de Producción Animal y Pasturas - Facultad de
Agronomía, Universidad de la República- Uruguay**

**Ana Inés Trujillo; Ing. Agr., MSc., PhD.,
Departamento de Producción Animal y Pasturas - Facultad de
Agronomía, Universidad de la República- Uruguay**

PÁGINA DE APROBACIÓN



ACTA DE EXAMEN

CURSO: Defensa de Tesis de Maestría

LUGAR Y FECHA DE LA DEFENSA: IPAV- Facultad de Veterinaria, Libertad, San José,
10 de abril de 2015

TRIBUNAL: Dres. Georgett Banchemo (Presidente), Virginia Beretta, Ana Inés Trujillo

CI ESTUDIANTE	NOMBRE	CALIFICACIÓN	NOTA
4.732.964-3	ANTÚNEZ TORT, Germán	S.S.S.	12

PRESENTADOS	NO PRESENTADOS	APROBADOS	APLAZADOS	INSCRIPTOS
1	0	1	0	1

TRIBUNAL

FIRMA

Dra. Georgett Banchemo (Presidente)

Dra. Virginia Beretta

Dra. Ana Inés Trujillo

NOTA: La calificación mínima para aprobar el examen es B.B.B (6)



**FACULTAD DE VETERINARIA
Programa de Posgrados**

ACTA DE APROBACIÓN DE TESIS

DE MAESTRÍA EN NUTRICIÓN DE RUMIANTES

**“FRECUENCIA DIARIA DE SUPLEMENTACIÓN EN BOVINOS
Efectos Sobre el Aprovechamiento Digestivo y Metabólico de la
Dieta, la Actividad Fermentativa y el Ambiente Ruminal”**

Por: Dr. Germán Antúnez Tort
Director de Tesis: Dr. José Luis Repetto
Codirectora de Tesis: Dra. Cecilia Cajarville

Tribunal

Presidente: Dra. Georgett Banchemo

Segundo Miembro: Dra. Virginia Beretta

Tercer Miembro: Dra. Ana Inés Trujillo

Fallo del Tribunal: Aprobada con Mención

**I.P.A.V., Facultad de Veterinaria, Libertad, S. José,
10 de abril de 2015**

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento a:

La Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC) de la Universidad de la República, por el apoyo otorgado a través del *Proyecto de iniciación a la investigación, 2013*.

La Comisión Académica de Posgrados (CAP) de la Universidad de la República por la “*Becas de apoyo a docentes para estudios de posgrado en la Universidad de la Republica 2013*” (período 2013-2015).

A mis tutores José Luis Repetto y Cecilia Cajarville por su apoyo durante todo este proceso.

A los ya colegas y estudiantes de Facultad de Veterinaria: Emilio Gutiérrez, Romina Rostagnol, Ignacio Saravia, Martín Guichón, Matías Garretano, Bruno Guidi, Sebastián Zamora, Rodrigo Zamora, Ignacio Huelmo, Juan Martín Machado, Pablo Avellanal, Ana Mangado, Álvaro Gutiérrez, Ronal Santellán, Luis Crucchi y Juan Ignacio Dellepiane por su colaboración en el manejo de los animales, mediciones, muestreos, análisis de laboratorio y especialmente por su amistad.

A los compañeros del equipo e integrantes de los departamentos de Bovinos y de Nutrición de la Facultad de Veterinaria: Álvaro Santana, Carolina Fiol, Martín Aguerre, Alejandro Mendoza, Álvaro González, Alejandro Britos, Sebastián Brambillasca, Analía Pérez, Nicolle Pomiés, Alicia Félix, Gonzalo Fernández, Sebastián Basantes, Sebastián De Trinidad, Alsiane Capelesso y Sofía Stirling.

A lo encargados y funcionarios del campo experimental N° 2 de la Facultad de Veterinaria en Libertad, por su apoyo y colaboración, especialmente a Federico de León, Maximiliano Pastorini y Elena de Torres.

Al personal de COLAVECO, especialmente a Yeni Madera, por su colaboración en los análisis de composición química de los alimentos.

Muy especialmente a Mariana por su constante apoyo a lo largo de este proceso y su colaboración en la lectura y revisión de los manuscritos.

A mi familia en especial a mis padres Honorina y Manuel, a mis abuelas Delbia y Eva, a mis hermanos Ernesto, Francisco, Patricio y Eugenia Antúnez Tort.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS	i
LISTA DE ABREVIATURAS	ii
1. RESUMEN	1
2. SUMMARY	2
3. INTRODUCCIÓN	3
4. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS	4
4.1. RESPUESTA A LA SUPLEMENTACIÓN	4
4.1.1. Características de las pasturas	5
4.1.2. Tipos de concentrados y niveles de suplementación	6
4.1.3. Sincronización del aporte de nutrientes en rumen	7
4.2. ESTRATEGIAS DE SUMINISTRO DEL CONCENTRADO	8
5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	10
6. HIPÓTESIS	11
7. OBJETIVOS	11
8. ESTRATEGIA DE LA INVESTIGACIÓN	11
9. MATERIALES Y MÉTODOS	12
9.1. LUGAR, ANIMALES Y ALIMENTOS	12
9.2. TRATAMIENTOS	12
9.3. EXPERIMENTO <i>in vivo</i>	13
9.3.1. Muestras, cálculos y determinaciones	13
9.3.2. Análisis estadísticos	14
9.4. EXPERIMENTOS <i>in vitro</i>	16
9.4.1. Producción de gas <i>in vitro</i>	16
9.4.2. Digestibilidad verdadera <i>in vitro</i>	17
9.4.3. Análisis estadístico	18
10. RESULTADOS	19
10.1. EXPERIMENTO <i>in vivo</i>	19
10.2. EXPERIMENTO <i>in vitro</i>	25
10.2.1. Producción de gas <i>in vitro</i>	25
10.2.2. Digestibilidad verdadera <i>in vitro</i>	26
11. DISCUSIÓN	27
12. CONCLUSIONES	33
13. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34
APÉNDICE	40
ANEXO I	44
ANEXO II	45

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

CUADROS		pág.
CUADRO I.	Composición química de los alimentos	12
CUADRO II.	Composición química de los sustratos incubados en los experimentos <i>in vitro</i>	16
CUADRO III.	Consumo, digestibilidad aparente de la dieta, excreción y balance de nitrógeno de vaquillonas no suplementadas o suplementadas con grano de maíz a razón de 1% del peso vivo a distintas frecuencias diarias	19
CUADRO IV.	Comportamiento y tasa de ingestión de vaquillonas no suplementadas o suplementadas con grano de maíz a razón de 1% del peso vivo a distintas frecuencias diarias	20
CUADRO V.	Media diaria de pH ruminal y concentraciones de N-NH ₃ y AGV de vaquillonas no suplementadas o suplementadas con grano de maíz molido a razón de 1% del peso vivo a distintas frecuencias diarias	22
CUADRO VI.	Parámetros de producción de gas <i>in vitro</i> de inóculos ruminales de vaquillonas suplementadas o no con grano de maíz molido a razón de 1% del peso vivo a distintas frecuencias diarias	25
CUADRO VII.	Porcentaje de digestibilidad verdadera <i>in vitro</i> de inóculos ruminales de vaquillonas suplementadas o no con grano de maíz molido a razón de 1% del peso vivo a distintas frecuencias diarias	26
FIGURAS		pág.
FIGURA 1.	Ingestión de MS de la pastura y MS total de vaquillonas no suplementadas o suplementadas a diferentes frecuencias diarias con grano de maíz molido a razón de 1% del peso vivo	21
FIGURA 2.	Concentración de AGV totales, N-NH ₃ y pH ruminal de vaquillonas no suplementadas o suplementadas a diferentes frecuencias diarias con grano de maíz molido a razón de 1% del peso vivo	23

LISTA DE ABREVIATURAS

<i>a</i>	Producción potencial de gas <i>in vitro</i>
AGV	Ácidos grasos volátiles
BN	Balance de nitrógeno
DIG _a	Digestibilidad aparente <i>in vivo</i>
DIG _t	Digestibilidad verdadera total <i>in vitro</i>
EE	Extracto al éter
FAD	Fibra ácido detergente
FND	Fibra neutro detergente
<i>kd</i>	Tasa fraccional de producción de gas <i>in vitro</i>
<i>lag time</i>	Tiempo de latencia de la producción de gas <i>in vitro</i>
MO	Materia orgánica
MS	Materia seca
N	Nitrógeno
NDT	Nutrientes digestibles totales
N-NH ₃	Nitrógeno amoniacal
PB	Proteína bruta (N × 6,25)
PV	Peso vivo
PV ^{0,75}	Peso vivo metabólico
T0	Consumo de pastura <i>ad libitum</i> sin suplementación
T1	Consumo de pastura <i>ad libitum</i> y suplementación con maíz a razón de 1% del PV suministrado una sola vez al día
T2	Consumo de pastura <i>ad libitum</i> y suplementación con maíz a razón de 1% de su peso vivo suministrado dos veces al día
T8	Consumo de pastura <i>ad libitum</i> y suplementación con maíz a razón de 1% de su peso vivo suministrado ocho veces al día

1. RESUMEN

El objetivo fue evaluar el efecto de la suplementación y la frecuencia diaria de suplementación (FS) en vaquillonas de carne sobre el consumo, la actividad fermentativa ruminal (AFR) y el aprovechamiento digestivo-metabólico de la dieta. Veinte vaquillonas Hereford (255 ± 22 kg peso vivo- PV) con catéteres ruminales, fueron alimentadas *ad libitum* con una pastura y no se suplementaron (T0) o se suplementaron con grano de maíz a razón de 1% del PV ofrecido una (T1), dos (T2) u ocho veces (T8) al día. Luego de 10 días de adaptación a la dieta, se determinó durante 10 días el consumo total y de pastura; durante 7 días se realizó además la colecta total de heces y orina para determinar la digestibilidad aparente (DIG_a), la excreción y el balance de nitrógeno (N). A través de los catéteres ruminales se colectó líquido ruminal durante 24 horas para la determinación del pH, las concentraciones de nitrógeno amoniacal (N-NH₃) y ácidos grasos volátiles (AGV). Simultáneamente se realizaron dos experimentos *in vitro*, en los que a partir de inóculos ruminales, se evaluó la AFR mediante la producción de gas y la digestibilidad verdadera *in vitro* (DIG_t). Todos los datos fueron analizados mediante el PROC MIXED de SAS (2002) y en todos los casos fueron declaradas diferencias significativas con $P\leq 0,05$ y tendencias cuando $0,05 < P < 0,10$. En los análisis de consumo, DIG_a así como el consumo, excreción y balance de N, se incluyeron el efecto fijo del tratamiento (T), el efecto fijo lineal o cuadrático de la suplementación y la FS; y el efecto aleatorio del bloque. El análisis de los parámetros ruminales (pH, AGV, N-NH₃), tasa de ingestión y comportamiento se realizó como medidas repetidas en el tiempo, considerando el efecto fijo del T, hora de muestreo (H), la T×H y el efecto aleatorio del bloque. Los parámetros de producción de gas (*a*, *kd* y *Lag time*) y DIG_t fueron analizados considerando el efecto del T, los sustratos (S) y T×S. Las vaquillonas suplementadas tuvieron un mayor consumo de MS y MO; y no se produjeron cambios en el consumo de estas fracciones conforme se incrementó la FS. El consumo de pastura fue similar entre tratamientos y por lo tanto la suplementación provocó una adición del consumo total. No hubo efecto de la suplementación sobre la DIG_t de la MS y la DIG_a de las fracciones de la dieta. La suplementación provocó escasos efectos sobre el ambiente ruminal y concuerda con los escasos efectos encontrados en las evaluaciones de la AFR. No hubo diferencias en la producción y la tasa de producción de gas y solo hubo diferencias en el *Lag time* de T8 cuando el sustrato fue raigrás ($P < 0,05$). Con pasturas maduras, la suplementación con maíz a razón de 1% del PV incrementa el consumo de MS y MO sin afectar el consumo de forraje y no hubo efecto de la frecuencia de suplementación. La suplementación provocó ligeros cambios en el ambiente ruminal y el aprovechamiento digestivo-metabólico de la dieta.

Palabras claves: suplementación de rumiantes, frecuencia de suplementación, pasturas templadas, concentrados energéticos.

2. SUMMARY

The aim of this work was to evaluate the effects of supplementation and the daily frequency of supplementation (FS) of heifers on feed intake, ruminal fermentative activity (RFA) and digestive-metabolic feedstuff utilization. Twenty heifers (255 ± 22 kg live weight- LW) with ruminal catheters were randomly assigned to four treatments. Animals were fed pasture ad libitum and non-supplemented (T0), or supplemented with corn grain at 1% of LW offered in one (T1), two (T2) or eight (T8) meals per day. After 10 days of adaptation, dry matter (DM) intake was determined during 10 days and during 7 of those days apparent digestibility (DIG_a) and N intake, excretion and balance were determined by total collection of faeces and urine. Rumen fluid was collected for 24 hours through ruminal catheters to determine pH and NH_3-N and AGV concentrations. Ruminal inoculum activity was evaluated by gas production and in vitro true digestibility (DIG_t). All data were analysed by PROC MIXED (SAS, 2002) and in all cases were declared significant differences with $P \leq 0.05$ and trends when $0.05 < P < 0.10$. Analyses of intake, DIG_a , N excretion and balance included the fixed effect of treatment (T), linear or quadratic fixed effect of supplementation and the FS and the random effect of the block. The ruminal parameters (pH, VFA, NH_3-N), intake rate and behaviour were analysed considering the fixed effect of T, hours (H), $T \times H$ and random effect of block. Gas production parameters and DIG_t were analysed considering the effect of T, substrates (S) and $T \times S$. Supplemented heifers had higher DM and OM intakes and there was no increase in consumption of these fractions as the SF increased. Pasture intake was similar between treatments, therefore, supplementation caused an addition of total DM and OM intake. There was no effect of supplementation frequency on DM, DIG_t and DIG_a of the diet. Supplementation induce slight effect on the rumen environment, which were consistent with slight effects found in ruminal inoculum activity evaluations. Supplementation frequency did not affect the potential gas volume or the fractional rate of gas production ($P > 0.05$) and there were only longest Lag time in T8 when the substrate was ryegrass ($P < 0.05$). With mature pastures, supplementation with corn at 1% of LW increases total DM and OM intake but did not affect pasture intake and no effect of daily supplementation frequency was detected. The supplementation produce only slight changes in the rumen environment and digestive-metabolic feedstuff utilization.

Keywords: supplementation of ruminants, frequency of supplementation, temperate pasture, concentrated energy.

3. INTRODUCCIÓN

La suplementación de rumiantes con granos de cereales es frecuentemente utilizada en sistemas ganaderos de las regiones templadas (Rearte y Pieroni, 2001), ya que permite aumentar la dotación de animales, la utilización de las pasturas (Reis y col., 2009), el aprovechamiento digestivo de la dieta y el desempeño productivo (Bargo y col., 2003).

Sin embargo cuando se suplementa a rumiantes alimentados en base a pasturas, no siempre se logran los resultados esperados (Moore y col., 1999). Estas diferencias se producen en parte como consecuencia de efectos asociativos a nivel digestivo (Dixon y Stockdale, 1999), ya que en general, la suplementación con granos de cereales provoca descensos en el pH ruminal en bovinos (Cajarville y col., 2006; Aguerre y col., 2013) y en ovinos (Aguerre y col., 2013; Tebot y col., 2012), siendo más importantes dichos descensos a mayores niveles de inclusión (Aguerre y col., 2013). El descenso en el pH ruminal afecta negativamente la degradabilidad ruminal (Farenzena y col., 2014) y la digestibilidad de la fracción fibrosa de la dieta (Tebot y col., 2012; Chase y Hibberd, 1989), como consecuencia de una menor adherencia bacteriana (Farenzena y col., 2014) así como una menor cantidad y actividad de la flora fibrolítica (Mould y col., 1983). Más allá del efecto negativo del descenso del pH ruminal sobre la flora fibrolítica como consecuencia de la inclusión de carbohidratos de rápida fermentación, existe un “*efecto carbohidrato*” asociado al sustrato fermentado per se, así como un efecto combinado de este y su interacción con el pH (Calsamiglia y col., 2008).

A pesar de ello, algunas estrategias de manejo de la alimentación, como la frecuencia diaria con la que se suministra el concentrado, podrían permitir la inclusión de granos de cereales a la dieta de rumiantes sin afectar negativamente la digestión del forraje. En este sentido una revisión de 15 trabajos que evaluaron frecuencias diarias de alimentación en ganado de carne en crecimiento, concluye que una mayor frecuencia de alimentación incrementa las ganancias diarias de peso vivo debido a un mayor consumo y eficiencia de utilización del alimento (Gibson, 1981). Trabajos posteriores reportan un ambiente ruminal más estable cuando el alimento fue ofrecido con mayor frecuencia (Yang y Varga, 1989; Aronen, 1991; Soto-Navarro y col., 2000; Robles y col., 2007). Sin embargo en la mayoría de los trabajos revisados, se evaluó la frecuencia de alimentación y no exclusivamente la frecuencia de suministro del concentrado (Yang y Varga, 1989; Soto-Navarro y col., 2000; Robles y col., 2007), se utilizaron dietas totalmente mezcladas (Robles y col., 2007; Schutz y col., 2011) o la alimentación base fueron forrajes conservados (Aronen, 1991).

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la suplementación y de la frecuencia diaria de suministro del concentrado a vaquillonas de carne sobre el consumo, el comportamiento, la actividad fermentativa ruminal, así como el aprovechamiento digestivo y metabólico de la dieta.

4. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

La suplementación de rumiantes con granos de cereales es frecuentemente utilizada en los sistemas ganaderos pastoriles de las regiones templadas (Rearte y Pieroni, 2001). En muchos casos la suplementación tiene como principales objetivos superar restricciones en cantidad o calidad de las pasturas que ocurren como consecuencia de cambios asociados a las estaciones del año (Van Soest, 1994). También es empleada como estrategia que permite aumentar la carga (kg PV/ha) y con ello la utilización de las pasturas (Reis y col., 2009; Bargo y col., 2003). En otras situaciones, la suplementación es empleada para balancear el aporte de nutrientes, mejorar la eficiencia de utilización del alimento o incrementar el desempeño productivo (Reis y col., 2009; Bargo y col., 2003).

Sin embargo la suplementación de rumiantes no siempre produce la respuesta productiva esperada (Bowman y Sanson, 1996; Moore y col., 1999). Estas diferencias entre la respuesta esperada y la alcanzada están dadas por múltiples interacciones entre variables asociadas a las características de los animales, de las pasturas y de la suplementación.

En situaciones en la que los animales pastorean, la suplementación no solo genera una serie de efectos a nivel digestivo, sino que también una serie de cambios asociados al comportamiento ingestivo e interacciones sociales entre los animales, a los que se suman factores relacionados con el manejo del pastoreo y la suplementación (Bargo y col., 2003). En dichas situaciones el análisis de los procesos que ocurren con la suplementación a nivel digestivo y metabólico puede ser imposibles de analizar.

Es por ello que la revisión que se presenta a continuación se centrará en los principales factores que a nivel digestivo-metabólico determinan la respuesta a la suplementación. Además se analizará la frecuencia de suministro del concentrado como estrategia para reducir los efectos asociativos negativos de la inclusión de granos de cereales en la dieta de rumiantes.

4.1. RESPUESTA A LA SUPLEMENTACIÓN

A nivel ruminal, el consumo de gramos de cereales genera una serie de interacciones denominadas “*efectos asociativos*”, que pueden ser positivos o negativos dependiendo de si incrementan o disminuyen el aprovechamiento digestivo y el consumo de alimentos (Dixon y Stockdale, 1999). Dichos efectos dependen fundamentalmente de las características de la pastura, así como de las características

y los niveles de inclusión del concentrado en la dieta (Bowman y Sanson, 1996; Dixon y Stockdale, 1999; Moore y col., 1999).

4.1.1. Características de las pasturas

Las *pasturas templadas* incluyen diversas especies de gramíneas y leguminosas, que pueden producir forraje de calidad variable (Van Soest, 1994), dependiendo esto entre otras cosas de las especies, la estación del año y los niveles de fertilización (Peyraud y Astigarraga, 1998). Su valor como alimento para los rumiantes, depende de la composición química, digestibilidad y de la capacidad de los rumiantes para consumirlas (Chávez, 2003).

Algunos trabajos nacionales reportan niveles de digestibilidad aparente de la MS de 63-64% en leguminosas (Pérez-Ruchel, 2010; Aguerre y col., 2013) y 70–75 % en gramíneas (Tebot y col., 2012; Santana, 2012; Félix, 2013). Sin embargo la calidad de las pasturas templadas fluctúa en forma muy marcada conforme cambian las estaciones del año y avanza su estado fenológico (Van Soest, 1994).

En general las pasturas templadas tienen sus mayores ritmos de crecimiento durante la primavera (Chávez, 2003), sin embargo en esta época del año, el aprovechamiento del forraje producido en general disminuye, debido a la menor eficiencia de cosecha durante el pastoreo y al descenso de la calidad del forraje (Chávez, 2003). El descenso de la calidad nutritiva en esta época del año ocurren como consecuencia de cambios en el estado fenológico, caracterizados por aumentos relativos de las fracciones fibrosas en detrimento de los contenidos celulares (Jung y Allen, 1995). Al incremento de la fracción fibrosa, se suma el descenso de la calidad como consecuencia de la impregnación de lignina en la pared celular, con lo que se reduce la digestibilidad de la pared celular de los vegetales, disminuye el tránsito digestivo, el consumo voluntario y el desempeño productivo de los rumiantes (Jung y Allen, 1995).

Estas situaciones se producen típicamente en nuestro país a mediados de la primavera cuando los verdeos de invierno tienen una alta producción de forrajes y los mismos son pastoreados previo a la floración. En estos casos muchas veces los animales son suplementados con granos de cereales, sin embargo su desempeño productivo suele ser inferior al logrado durante otoño e invierno (UPIC, 2004).

Según un análisis realizado por Moore y col. (1999) en el que revisaron más de 60 trabajos publicados, encontraron que cuando son utilizando forrajes con una relación de nutrientes digestibles totales: proteína bruta menor a 7 (NDT/PB < 7), se produce un menor consumo voluntario de forraje a medida que se incrementa el consumo de suplemento. Esta relación de NDT/PB es observada en la mayoría de las situaciones cuando son utilizadas pasturas templadas implantadas, aún en la primavera cuando

las mismas tienen niveles de FND superiores al 60% y niveles de PB en torno al 10% de la MS. En cambio cuando el forraje tiene una relación NDT: PB > 7 ocurren solo pequeños cambios sobre el consumo voluntario de forraje (Moore y col., 1999).

4.1.2. Tipos de concentrados y niveles de suplementación

Los granos de cereales como el maíz, la cebada, el trigo y el sorgo son los suplementos energéticos utilizados tradicionalmente en la alimentación de rumiantes (Bowman y Sanson, 1996; Eastridge y Firkins, 2011); aunque también son utilizados frecuentemente subproductos industriales tales como melaza (Tebot y col., 2012), afrechillo, cascarilla de soja, pulpa de citrus (Britos y col., 2012) o de manzana (Ribeiro Filho y col., 2012), entre otros.

A nivel digestivo, el suministro de concentrados energéticos tiene como principales objetivos incrementar la densidad energética y la digestibilidad de la dieta (Dixon y Stockdale, 1999). En general, los granos de cereales, ricos en almidón son rápidamente fermentados por los microorganismos ruminales, generando rápidos incrementos en las concentraciones de AGV y caídas en pH ruminal (Cajarville y col., 2006; Tebot y col., 2012; Aguerre y col., 2013). En general, los valores mínimos de pH ruminal son alcanzados 1 - 4 hs luego de la ingestión de los mismos (Cajarville y col., 2006; Aguerre y col., 2009; Tebot y col., 2012).

Además del incremento en las concentraciones totales de AGV, ocurren cambios en el perfil de AGV que se producen. En general, al incorporar concentrados almidonosos a la dieta se observa una disminución relativa del acetato a favor de un incremento relativo del propionato (Aguerre y col., 2013). Hasta hace algunos años no se sabía con exactitud si los cambios en el perfil de AGV era producto de cambios en el pH ruminal o debido a cambios en la flora ruminal (Calsamiglia y col., 2008). En la actualidad existe evidencia que, la digestibilidad de la MO y la fibra así como la producción de acético están relacionadas fundamentalmente con el pH ruminal; mientras que la producción total de AGV y la concentración de propionato se deben al efecto combinado del pH ruminal y a cambios en la flora ruminal asociados al sustrato fermentado (Calsamiglia y col., 2008).

El descenso en el pH ruminal asociado a una actividad fermentativa más intensa y una mayor concentración de AGV, afecta negativamente la degradabilidad ruminal (Farenzena y col., 2014) y la digestibilidad de la fracción fibrosa de la dieta (Chase y Hibberd, 1989; Tebot y col., 2012). Algunos trabajos sugieren que este efecto se produce como consecuencia de una menor adherencia bacteriana (Farenzena y col., 2014) y una menor cantidad y actividad de la flora celulolítica (Mould y col., 1983) asociada al pH ruminal y al tipo de sustrato fermentado (Calsamiglia y col., 2008).

Algunos autores han mencionado que de todos los factores que afectan el consumo de forraje de los rumiantes, la cantidad de concentrados en la dieta es uno de los más importantes (Feverdin y col., 1991). A bajos niveles de suplementación se producen pequeños o nulos efectos sobre la digestibilidad del forraje, mientras a niveles altos se producen efectos asociativos negativos (Bowman y Sanson, 1996). Esto fue cuantificado por Moore y col. (1999), quienes a partir de la revisión de más de 60 trabajos publicados, encontraron que a niveles de suplementación en los que el aporte de nutrientes digestibles totales (NDT) es menor a 0,7% del PV ocurren tanto efectos asociativos positivos como negativos sobre el consumo; mientras que con niveles de suplementación mayores a 0,7% del PV se observan en la mayoría de los casos efectos asociativos negativos (Moore y col., 1999).

Recientemente, Aguerre y col. (2013) reportan un efecto significativo del nivel de suplementación (5, 10 o 15 g MS de sorgo/kg PV) sobre el consumo de forraje, siendo este menor a mayores niveles de suplementación. Reportan además, diferencias en la respuesta en bovinos y en ovinos, mientras que en ovinos se produjo una drástica reducción del consumo de MS y digestibilidad de la dieta a niveles de suplementación de 1% del PV, en bovinos no fueron detectados estos efectos a los mismos niveles de suplementación.

4.1.3. Sincronización del aporte de nutrientes en rumen

En rumiantes, la digestión y el metabolismo del N y los carbohidratos están fuertemente relacionados. Se ha propuesto que la suplementación con carbohidratos de rápida fermentación podría sincronizar el aporte de energía y proteína a la microflora ruminal (Chilibroste y col., 2005, Hersom, 2008), permitiendo esto incrementar la actividad fermentativa, la digestibilidad (Hersom, 2008) y la utilización ruminal de los compuestos nitrogenados (Castillo y col., 2000).

Los cultivos forrajeros anuales tales como avena y raigrás son ampliamente utilizados en los sistemas ganaderos de la región. Cuando los rumiantes consumen estas pasturas, con altos niveles de proteína degradable en rumen, se producen elevadas concentraciones de nitrógeno amoniacal (N-NH₃; Reis y Combs, 2000; Pérez-Ruchel, 2010; Santana, 2012; Aguerre y col., 2013; Félix, 2013). En estas situaciones, la suplementación con concentrados energéticos disminuye la concentración de N-NH₃, mejora la utilización del N en rumen (Reis y Combs, 2000) y reduce la excreción de N en orina (Castillo y col., 2000).

Pero cuando estas pasturas son escasamente fertilizadas (Delagarde y col., 1997; Peyraud y Astigarraga, 1998) o se encuentran en estados de madurez avanzada previo a la floración, suelen presentar bajos niveles de proteína y niveles crecientes de fibra (Arelovich y col., 2003); produciendo en general una menor ganancia diaria

de PV (UPIC, 2004; Roberts y col., 2009). En estas situaciones la suplementación con granos de cereales es frecuentemente utilizada con el objetivo de incrementar la utilización de las pasturas, el aporte de nutrientes y el desempeño productivo.

Sin embargo, pasturas con bajos niveles de proteína cruda suelen producir bajas concentraciones de N-NH₃ en rumen (Delagarde y col., 1999), pudiendo ser incluso inferiores a los niveles mínimos requeridos para la actividad de la microflora ruminal (Bryant y Robinson, 1961; Satter y Slyter, 1974), lo que podría reducir la actividad de la flora celulolítica y la digestión de la fibra (Delagarde y col., 1999). Por esto, la suplementación con carbohidratos de rápida fermentación podría acentuar el déficit de N en rumen, de gran importancia para la flora fibrolíticas (Kozloski, 2011).

4.2. ESTRATEGIAS DE SUMINISTRO DEL CONCENTRADO

En general el consumo de alimentos muy digestibles genera una rápida actividad fermentativa, un rápido aumento de las concentraciones de AGV y caídas en el pH ruminal. Esto es frecuentemente observado 1-4 horas luego del consumo de concentrados energéticos, pero también luego del consumo de pasturas de alta calidad a elevados ritmos de ingestión asociados a periodos de acceso restringido a la pastura (Pérez-Ruchel, 2010; Félix, 2013). El suministro de dietas totalmente mezcladas, el acceso *ad libitum* y el suministro del alimento con mayor frecuencia genera un ambiente ruminal con menores fluctuaciones. Sin embargo cuando el concentrado es suministrado en forma separada, como ocurre cuando se suplementa a rumiantes en pastoreo, se producen importantes fluctuaciones en el pH y las concentraciones ruminales de N-NH₃ y AGV, que pueden afectar negativamente la digestión de la dieta.

La frecuencia con la que se suministra el concentrado energético ha sido estudiada básicamente bajo dos enfoques. Por un lado, se ha analizado la menor frecuencia de suministro de concentrados, visualizando la suplementación en una escala semanal y con el objetivo de reducir la carga de trabajo de la mano de obra. Otros trabajos sin embargo han evaluado la frecuencia diaria de suministro del concentrado, siendo el foco el consumo y aprovechamiento digestivo de la dieta.

Sobre el segundo enfoque, existen dos revisiones que analizan los resultados de trabajos publicados en los que se evaluó este efecto en ganado de carne (Gibson, 1981) y en ganado de leche (Gibson, 1984). En ganado de carne en crecimiento Gibson (1981) reporta una mayor ganancia de PV cuando los mismos fueron alimentados con mayor frecuencia, lo que es atribuido a un mayor consumo y aprovechamiento digestivo del alimento.

Una serie de trabajos posteriores profundizaron el análisis de los efectos de la frecuencia de alimentación sobre el consumo y el aprovechamiento digestivo de la dieta. Aquellos trabajos en los que los niveles de forraje en la dieta fueron menores al 50%, no reportan incrementos en el consumo de MS (Robles y col., 2007; Schutz y col., 2011). Sin embargo en trabajos con niveles de forraje en la dieta mayores al 50%, los resultados son diversos: mientras que en algunos se reportan mayores consumo de MS (Aronen, 1991), otros no reportan diferencias (Yang y Varga, 1989; Hashem, 2000; Kozloski y col., 2009) o reportan un menor consumo (Pulido y col., 2009). No obstante, es necesario precisar que en todos estos trabajos se utilizaron forrajes conservados, dietas completamente mezcladas y/o el acceso al alimento fue restringido en cantidad.

En la mayoría de los trabajos revisados que analizaron el ambiente ruminal reportan una mayor estabilidad del pH y las concentraciones de N-NH₃ y AGV cuando se alimentó con mayor frecuencia (Yang y Varga, 1989; Aronen, 1991; Soto-Navarro y col., 2000; Robles y col., 2007). Este hecho podría estar dado por menores consumos instantáneos de concentrado, una actividad fermentativa más estable y una mejor sincronización en el aporte de energía y proteína en la dieta.

5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En síntesis, parecería que los efectos negativos como consecuencia del agregado de carbohidratos de rápida fermentación a la dieta de rumiantes, están relacionados fundamentalmente con el tipo de concentrado energético, el nivel de inclusión en la dieta y de las características de la pastura.

A pesar que la reducción de la carga de trabajo y la simplificación de las estrategias de suplementación son deseadas a nivel productivo, resulta de gran importancia desarrollar alternativas y comprender los procesos que a nivel digestivo-metabólico maximizan la eficiencia de utilización del suplemento y de la pastura. La frecuencia diaria de suministro del concentrado parecería ser una alternativa interesante del manejo de la suplementación, ya que algunos trabajos reportan incrementos en el consumo de alimentos y mayor aprovechamiento digestivo de la dieta, que podrían ser atribuidos a menores fluctuaciones en las concentraciones de N-NH₃, AGV y pH ruminal cuando a los bovinos se les suministró carbohidratos de rápida fermentación con mayor frecuencia diaria. Dichos resultados son atribuidos a una actividad fermentativa ruminal más estable, que reduciría los efectos negativos sobre la microflora celulolítica y sobre la digestión del forraje.

Sin embargo, en la mayoría de los trabajos que evaluaron la frecuencia de suministro del concentrado se han utilizado forrajes conservados (ensilajes) o el acceso de los animales a este fue restringido. Resulta necesario entonces generar información acerca de la frecuencia de suplementación en bovinos de carne que contemple algunas de las condiciones productivas más frecuentes a nivel nacional, como el uso de forraje fresco, la suplementación con granos de cereales y el suministro del suplemento una sola vez al día a razón de 1% del peso vivo de los animales.

6. HIPÓTESIS

El fraccionamiento durante el día del suministro de granos de maíz a bovinos con una dieta basada en el consumo de una pastura madura y suplementados a razón de 1% del peso vivo (PV), producirá una actividad fermentativa más estable y una mayor utilización digestiva-metabólica de la dieta.

7. OBJETIVOS

Evaluar en vaquillonas de carne con una dieta basada en una pastura templada madura, el efecto de la suplementación y la frecuencia diaria de suministro de grano de maíz a niveles de 1% del PV sobre:

- El consumo de las distintas fracciones de la dieta y del forraje.
- El comportamiento y la tasa de ingestión de los alimentos.
- El aprovechamiento digestivo y metabólico de la dieta.
- La actividad fermentativa ruminal, así como la dinámica y las concentraciones de ácidos grasos volátiles, amoníaco y el pH ruminal.

8. ESTRATEGIA DE LA INVESTIGACIÓN

Los trabajos experimentales se realizaron en el Campo Experimental N°2 de la Facultad de Veterinaria, Universidad de la República (34°41'S, 56°32'O) entre los meses de setiembre y noviembre.

Para probar las hipótesis y cumplir con los objetivos planteados fueron desarrollados tres ensayos experimentales simultáneos, uno de ellos *in vivo* en el que se utilizaron vaquillonas de carne como modelo experimental y dos ensayos *in vitro*, en los que se emplearon las técnicas de digestibilidad verdadera *in vitro* (DIGt) y la producción de gas *in vitro* como herramientas para evaluar la actividad fermentativa del ecosistema ruminal.

En el APÉNDICE se adjunta un artículo publicado con algunos de los resultados obtenidos.

Antúnez G., Cajarville C., Britos A., González A., Repetto J.L. (2014). Ruminal inoculum activity in cattle supplemented with corn grain at different daily frequencies: evaluation by *in vitro* gas production technique. *Animal Production Science*. 54:1662–1664.

9. MATERIALES Y MÉTODOS

9.1. LUGAR, ANIMALES Y ALIMENTOS

Se utilizaron 20 vaquillonas Hereford de 18 meses de edad y 255 ± 22 kg de peso vivo (PV). Las mismas fueron agrupadas por PV en cinco bloques y asignadas en forma aleatoria a uno de los cuatro tratamientos ($n=5$ por tratamiento). Previamente se le colocó a cada vaquillona un catéter ruminal de polietileno (5×110 mm) a través del flanco. Todas las manipulaciones con animales fueron realizadas de acuerdo al protocolo aprobado por la Comisión de Ética en el Uso de Animales (CEUA FVET-PI 11).

El experimento consistió en 10 días de adaptación de las vaquillonas a las instalaciones y a las dietas según cada tratamiento, seguido de 17 días de mediciones y muestreos. Durante todo el período las vaquillonas permanecieron en jaulas metabólicas individuales y se les ofreció agua y forraje *ad libitum*. Diariamente el forraje, obtenido de una pastura compuesta principalmente por Raigrás (CUADRO I) fue cortado (12:00 hs AM) y ofrecido fresco. Previo al período de adaptación los animales fueron habituados durante 4 semanas al manejo con bozales y al consumo de grano de maíz.

CUADRO I. Composición química de los alimentos utilizados (media \pm DE) ^a

	MS	MO	PB	FND	FAD	EE
Forraje ^b	24 \pm 1,4	91 \pm 0,1	9 \pm 0,8	53 \pm 6,2	35 \pm 7,9	2 \pm 0,2
Suplemento ^c	82 \pm 0,2	99 \pm 0,5	7 \pm 0,2	10 \pm 0,5	3 \pm 0,4	4 \pm 0,3

^a MS: % de materia seca; MO: materia orgánica como % de la MS; PB: proteína bruta ($N \times 6,25$) como % de la MS; FND: fibra neutro detergente utilizando amilasa termorresistente y sulfato de sodio, expresada como % de la MS descontando el contenido de cenizas; FAD: fibra ácido detergente determinada en forma no secuencial y expresada como % de la MS, descontando el contenido de cenizas; EE: extracto al éter como % de la MS.

^b Compuesta por: 98,5% de *Lolium multiflorum* y 1,5% de *Trifolium repens* ($n=10$).

^c Grano de maíz seco y molido ($n=2$).

9.2. TRATAMIENTOS

Las vaquillonas se agruparon en cuatro tratamiento, según los cuales recibieron forraje *ad libitum* como único alimento (T0), o forraje *ad libitum* y suplementación con maíz molido a razón de 1% del PV ofrecido a lo largo del día en una (T1; 9:00 horas), dos (T2; 9:00 y 21:00 horas) u ocho (T8; 09:00, 10:45, 12:30, 14:15, 16:00, 17:45, 19:30 y 21:00 h) fracciones diarias de igual cantidad.

Sobre los mismos animales que se realizaron las determinaciones y muestreos del experimento *in vivo* que se describen en el punto 9.3, se realizó además la extracción de líquido ruminal para las evaluaciones *in vitro*, que se describen en el punto 9.4.

9.3. EXPERIMENTO *in vivo*

9.3.1. Muestreos, cálculos y determinaciones

Diariamente se tomaron muestras de forraje y dos muestras de maíz (una al inicio y otra al final del período de mediciones), a partir de las cuales se determinó MS (60°C por 48 hs), MO (550°C x 4 hs) y PB (N × 6,25) de acuerdo con AOAC (1990). Las determinaciones de FND y FAD se realizaron según Mertens (2003).

El consumo de MS, MO, PB, FND y FAD se calculó diariamente, durante 10 días consecutivos, por diferencia entre la cantidad ofrecida y rechazada de alimentos [Consumo (g) = (g ofrecidos - g rechazados)]. Durante ese mismo periodo pero durante 7 días se realizó la colecta total de heces y orina emitida diariamente por cada vaquillona. La orina fue colectada utilizando sondas vesicales Foley y recipientes plásticos con ácido sulfúrico al 10% como conservante. El volumen de orina fue registrado y se tomaron submuestras diarias proporcionales al total excretado, diluyendo con agua destilada hasta un volumen final de 50 mL y congeladas a -18°C para la posterior determinación de la concentración de N.

Los kg totales de heces fueron registrados y se tomaron muestras representativas de 500 g, que fueron congelada a -18°C hasta su posterior análisis de MS, MO, N, FND y FAD (AOAC, 1990). Con las muestras diarias se confeccionaron para cada animal muestras compuestas (pool) respetando las proporciones excretadas cada día y a partir de estas se determinó la digestibilidad aparente *in vivo* (DIGa) de las distintas fracciones de la dieta (MS, MO, N, FND y FAD) de la siguiente forma:

$$DIGa = \frac{(g \text{ consumidos} - g \text{ en heces})}{g \text{ consumidos}}$$

El balance de N (BN) se calculó como:

$$BN (g/d) = g \text{ N ingerido} - (g \text{ N en heces} + g \text{ N en orina})$$

El pH ruminal se determinó mediante pHmetro (Cole Parmer, Illinois, EUA) directamente del líquido ruminal colectado a través de las catéteres ruminales a las horas 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 15, 18 y 21, considerando a las 9:00 hs AM (hora del primer suministro de maíz en los tratamientos T1, T2 y T8) como hora cero de mediciones.

Para determinar las concentraciones de acético, propiónico y butírico se colectaron muestras de líquido ruminal cada tres horas. A dichas muestras se les adicionó ácido perclórico 0,1 M como conservante (50:50, v/v) y fueron congeladas a -18°C hasta su posterior análisis. Las concentraciones de acetato, propionato y butirato (mmol/L) se determinaron en cada muestra mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC; Dionex UltiMate 3000®, Dionex Corporation, Sunnyvale, EUA) usando una columna Acclaim de $300 \times 7,8$ mm [Rezex ROA-Organic Acid H⁺ (8%), Phenomenex, EUA], de acuerdo a los procedimientos descritos por Adams y col. (1984). La concentración de AGV totales se calculó como la suma de las concentraciones de acetato, propionato y butirato; se calculó además la relación entre la concentración de acetato y propionato.

Otra sub muestra de 0,5 mL de líquido ruminal (colectadas cada 3 hs durante 24 hs) fue conservada en ácido sulfúrico (diluido al 50%) y congelada a -18°C , para la posterior determinación de la concentración de N-NH₃ (mg/dL) por colorimetría (Weatherburn, 1967). Las muestras fueron analizadas mediante espectrofotometría (Unico 1200 series, United Products y Instruments, Inc, NJ, EEUU) por duplicado.

Durante tres días no consecutivos se registró el comportamiento de cada animal cada 10 minutos durante 12 horas (9:00- 21:00 h) mediante la técnica de "*scan-sampling*" según la metodología propuesta por Hirata y col. (2002). Se realizaron observaciones directas de las actividades de los animales las cuales fueron clasificadas en 3 categorías: come, rumia y otros (la que incluyó descanso y consumo de agua). El comportamiento de los animales fue registrado por dos observadores, por lo que cada observador registró la actividad de 10 animales. Se registraron 72 observaciones/animal/día, obteniendo un total de 216 observaciones por animal. De este modo, se calculó para cada hora de observación la frecuencia relativa promedio de cada una de las actividades para cada vaquillona durante cada día de observación.

La tasa de ingestión se determinó durante un día mediante el pesaje de la cantidad de cada alimento (maíz y forraje) ofrecido y rechazado por animal por hora, durante 12 horas a partir de la hora cero de mediciones y muestreos (09:00 h). De esta forma se obtuvo para cada animal en cada hora, el consumo de MS total y de pastura.

9.3.2. Análisis estadísticos

Todos los análisis estadísticos fueron realizados con la versión 9.0 del software SAS (SAS Institute Inc, Cary, NC, EE.UU.). El consumo de las distintas fracciones de la dieta (MS, MO, PB, FND, FAD), el consumo de N, la excreción de N, el balance de N y la digestibilidad de las distintas fracciones (MS, MO, PB, FND, FAD), fueron analizadas mediante PROC MIXED de SAS (2002). El efecto de la suplementación se analizó por contrastes en el que se comparó la media de T0 con la de todos los

tratamientos con suplementación (S), mientras que el efecto de la frecuencia de suplementación (T1, T2 y T8) se analizó por regresión lineal y cuadrática según el siguiente modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + B_j + e_{ijk},$$

donde Y_{ijk} es la variable en estudio, μ la media, T_i el efecto del tratamiento, B_j el efecto aleatorio del bloque y e_{ijk} la sumatoria de errores.

El pH ruminal, las concentraciones de AGV, las concentraciones N-NH₃, la tasa de ingestión y el comportamiento fueron analizadas mediante PROC MIXED de SAS (2002) como medidas repetidas en el tiempo sobre cada animal según el siguiente modelo:

$$Y_{ijkl} = \mu + T_i + H_j + (T \times H)_{ij} + B_k + e_{ijkl},$$

siendo Y_{ijkl} la variable en estudio, μ la media, T_i el efecto del tratamiento, H_j el efecto hora, T_i por H_j la interacción tratamiento hora, B_k el efecto aleatorio del bloque y e_{ijkl} la sumatoria de errores. Fueron declaradas diferencias significativas con $P \leq 0,05$ y como tendencias valores de $0,05 < P < 0,10$. Cuando las interacciones fueron significativas o se detectaron tendencias, las medias de cada hora se compararon entre tratamientos. Las medias de los distintos tratamientos se separaron mediante el test de Tukey.

9.4. EXPERIMENTOS *in vitro*

El día 17 de mediciones y muestreos, se extrajo líquido ruminal de las vaquillonas para evaluar la actividad fermentativa del ecosistema ruminal mediante la técnica de producción de gas *in vitro* y digestibilidad verdadera *in vitro* empleando diferentes tipos de sustratos (CUADRO II).

CUADRO II. Composición química de los sustratos incubados en los experimentos *in vitro* (media \pm DE)

Alimento	MS	MO	PB	FND	EE
Granos de cereales					
Grano seco de maíz	82 \pm 0,1	99 \pm 0,5	7 \pm 0,2	10 \pm 0,5	4 \pm 0,31
Grano seco de sorgo	83 \pm 0,1	98 \pm 0,1	8 \pm 0,3	13 \pm 0,1	3 \pm 0,10
Grano húmedo de sorgo	63 \pm 0,2	98 \pm 0,1	7 \pm 0,2	9 \pm 0,1	3 \pm 0,02
Pasturas					
Alfalfa	19 \pm 0,01	91 \pm 0,1	21 \pm 0,6	33 \pm 0,3	3 \pm 0,01
Raigrás	18 \pm 0,01	89 \pm 0,2	10 \pm 0,8	50 \pm 0,8	3 \pm 0,08
Trébol blanco	13 \pm 0,01	90 \pm 0,3	25 \pm 0,8	38 \pm 0,5	4 \pm 0,13
Henos					
Paja de trigo	83 \pm 0,1	92 \pm 0,1	2 \pm 0,1	86 \pm 1,2	--
Raigrás	82 \pm 0,5	94 \pm 0,3	4 \pm 0,1	82 \pm 1,4	--
Avena	70 \pm 0,4	92 \pm 0,3	6 \pm 0,6	73 \pm 0,5	--

¹ MS: % de materia seca; MO: materia orgánica como % de la MS; PB: proteína bruta ($N \times 6,25$) como % de la MS; FND: fibra neutro detergente utilizando amilasa termorresistente y sulfito de sodio, expresada como % de la MS descontando el contenido de cenizas; EE: extracto al éter como % de la MS.

9.4.1. Producción de gas *in vitro*

El líquido ruminal fue incubado en 5 frascos en un medio libre de nitrógeno (Williams y col., 2005). En 3 de estos frascos se agregó 0,5 g de uno de los 3 sustratos seleccionados (Alfalfa, Trébol Blanco o Raigrás; CUADRO II), mientras que en los dos frascos restantes no se incubó sustrato y fueron utilizados como blanco; totalizando 25 frascos por tratamiento.

Para evaluar la actividad ruminal mediante la producción de gas, se incubaron 0,5 g de uno de los 3 sustratos seleccionados (Alfalfa, Trébol Blanco o Raigrás; CUADRO II) en frascos conteniendo un medio libre de nitrógeno (Williams y col., 2005) y 10 ml de líquido ruminal de una de las 20 vaquillonas en cada frascos. Por cada vaquillona, además de los 3 frascos conteniendo sustrato, se agregaron 2 frascos sin

sustrato que fueron utilizados como blanco. De esta manera se incubaron un total de 25 frascos por tratamiento.

Los frascos fueron saturados con CO₂, y sellados con tapones de goma, precinto de aluminio e incubados a 39 °C durante 96 horas. La producción de gas fue medida con manómetro digital (RZ-68601-00, Cole-Parmer, Vernon Hills, IL, USA) a 2, 4, 6, 8, 10, 12, 18, 24, 48, 72 y 96 horas desde el inicio de la incubación. Los valores de presión fueron convertidos en volumen mediante la siguiente ecuación de regresión obtenida en un experimento previo:

$$\text{Volumen (mL)} = (4,4 \times \text{Presión}) + (0,09 \times \text{Presión}^2); R^2 = 0,998$$

El volumen de gas de cada frasco fue ajustado a un modelo exponencial simple:

$$V \text{ (mL)} = a [1 - e^{-kd (t - \text{Lag time})}]$$

Donde V es el volumen de gas, a la producción potencial de gas en mL/g MO incubada, kd la tasa fraccional de producción de gas mL/hora y $Lag\ time$ es el tiempo de latencia en horas.

9.4.2. Digestibilidad verdadera *in vitro*

Para evaluar la actividad ruminal mediante la medición de la digestibilidad verdadera *in vitro*, se extrajo líquido ruminal de 3 vaquillonas por tratamiento (12 vaquillonas en total), que se utilizó individualmente como medio de incubación (inóculo) de 9 sustratos (CUADRO II).

Luego de la colecta, el líquido ruminal de cada vaquillona (400 mL por animal) fue mezclado con una solución buffer e incubado a 39 °C durante 48 horas en uno de los cuatro frascos de un equipo DAISY^{II} INCUBATOR ® (Ankom Technology Corp. Fairport, NY, USA). En cada uno de los frascos de digestión con líquido ruminal se incubaron por duplicado una colección de alimentos fibrosos (paja de trigo, de avena y de raigrás), forrajes (raigrás, alfalfa y trébol blanco) y granos de cereales (grano húmedo de sorgo, grano seco de sorgo y grano seco de maíz), ver detalles en el CUADRO II. Previo a la incubación todos los alimentos fueron secados (a 60 °C por 48 horas) y molidos a 1 mm. Un muestra de 0,5 g de alimento fue colocado en el interior de bolsas Ankom F57® (Ankom Technology Corp. Fairport, NY, USA). A dos de estas bolsas no se le agregó ningún alimento y fueron utilizadas como blanco. Luego de la incubación, las bolsas fueron enjuagadas con agua y posteriormente lavadas durante 1 hora a 100 °C con una solución detergente neutro en un analizador de fibra

Tecnal-TE-149® (Tecnal Equipamentos para Laboratório Ltda, Piracicaba, Brazil) y secadas en estufa a 100 °C hasta peso constante.

La digestibilidad verdadera total *in vitro* (DIGt) de cada sustrato fue calculada utilizando la metodología descrita por Ankom (Ankom Technology Corp.):

$$\text{DIGt (\% base MS)} = \frac{100 - (W_3 - (W_1 \times C_1))}{W_2 \times \text{MS}} \times 100$$

Donde, W_1 es el peso (g) de la bolsa; W_2 el peso (g) del sustrato; W_3 el peso final de la bolsa luego de la incubación *in vitro* y el lavado con solución neutro detergente; C_1 la corrección de la bolsa utilizada como blanco (peso final seco/peso inicial de la bolsa previo a la incubación); MS es el porcentaje de material seca del sustrato incubado.

Este procedimiento fue repetido en 3 tandas, en cada una de las cuales se incubaron los distintos alimentos (CUADRO II) con líquido ruminal de una vaquillona por tratamiento.

9.4.3. Análisis estadístico

El porcentaje de la DIGt y los parámetros de producción de gas *in vitro* (a , kd y $Lag\ time$) fueron analizados mediante PROC MIXED de SAS (2002), considerando el efecto fijo del tratamiento (T), el sustratos (S) y la interacción T por S según el siguiente modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + S_j + (T \times S)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

El análisis de la DIGt incluyó además el efecto aleatorio de la tanda de incubación. Fueron declaradas diferencias estadísticamente significativas cuando $P \leq 0,05$ y como tendencias valores de $0,05 < P < 0,10$. Cuando las interacciones fueron significativas o se detectaron tendencias, las medias de cada hora se compararon dentro de cada sustrato. Las medias de los distintos tratamientos se separaron mediante el test de Tukey.

10. RESULTADOS

10.1. EXPERIMENTO *in vivo*

El consumo y la digestibilidad de las distintas fracciones de la dieta se presentan en el CUADRO III.

CUADRO III. Consumo, digestibilidad aparente de la dieta, excreción y balance de nitrógeno (N) de vaquillonas no suplementadas o suplementadas con grano de maíz a razón de 1% del peso vivo (PV) a distintas frecuencias diarias

	Tratamientos ^a				EEM ^b	P-valor ^c		
	T0	T1	T2	T8		T0 vs. S	L	C
Proporción de maíz en la dieta	-	0,26	0,25	0,24	0,013	0,659	0,463	0,579
Consumo MS, g/kg PV ^{0,75}								
Total	107	126	131	132	0,006	0,044	0,479	0,560
Forraje	109	93	98	100	0,006	0,423	0,469	0,562
Suplemento	-	33	33	33	0,424	0,759	0,493	0,982
Consumo total, g/kg PV								
MS	26,9	31,4	32,8	33,2	1,595	0,046	0,449	0,561
MO	24,2	28,9	30,2	30,6	1,432	0,023	0,450	0,561
PB	2,5	2,8	2,9	2,9	0,146	0,116	0,423	0,519
FND	16,3	15,5	16,4	16,6	0,978	0,775	0,450	0,541
FAD	9,1	8,3	8,8	8,9	0,545	0,721	0,447	0,563
Consumo forraje, g/kg PV								
MS	26,9	23,2	24,6	25,0	1,598	0,889	0,443	0,562
MO	24,2	20,8	22,1	22,5	1,435	0,416	0,443	0,564
PB	2,5	2,1	2,2	2,3	0,146	0,407	0,499	0,541
FND	16,3	14,1	15,0	15,2	0,979	0,421	0,450	0,542
FAD	9,1	7,8	8,3	8,5	0,548	0,433	0,442	0,562
Digestibilidad aparente <i>in vivo</i>								
MS	0,74	0,70	0,74	0,71	0,022	0,198	0,665	0,054
MO	0,76	0,72	0,75	0,73	0,024	0,163	0,750	0,038
PB	0,74	0,65	0,58	0,61	0,028	0,050	0,780	0,317
FND	0,74	0,69	0,72	0,68	0,030	0,101	0,104	0,321
FAD	0,72	0,68	0,69	0,64	0,032	0,096	0,093	0,472
Consumo total de N, g/d	99	114	119	119	7,6	0,166	0,673	0,602
Excreción de N en heces, g/d	25	40	49	46	5,9	0,007	0,670	0,306
Excreción de N en orina, g/d	14	11	13	13	0,7	0,171	0,178	0,145
Balance de N ^d , g/d	61	62	57	59	8,9	0,959	0,908	0,625

^a Tratamientos: T0= pastura *ad libitum* sin suplementación; T1, T2, T8= pastura *ad libitum* y suplementación con grano de maíz a razón del 1% del PV suministrado una, dos u ocho veces al día respectivamente.

^b Error estándar de la media (n=5 por tratamiento).

^c Nivel de significancia para el contraste T0 vs. S = No suplementados vs. Suplementados; L = efecto lineal y C = efecto cuadrático de la frecuencia de suplementación. P-valores indican diferencias cuando $\leq 0,05$ y tendencias cuando $0,05 < P < 0,10$.

^d Balance de N (g/día) = g N ingeridos- (g N heces + g N orina).

Las vaquillonas suplementadas tuvieron un mayor consumo total de MS y MO que aquellas que sólo tuvieron acceso a la pastura ($P < 0,05$), esos mayores consumos estuvieron dados por el consumo del suplemento, dado que el consumo de todas las fracciones del forraje fueron similares en todos los tratamientos. No se detectaron efectos lineales o cuadráticos en el consumo de MS total o de la pastura entre los tratamientos suplementados.

La digestibilidad de la MS y la MO fueron superiores al 70% y no fueron afectadas por la suplementación. Solamente se detectó un efecto cuadrático en la digestibilidad de la MO en las vaquillonas suplementadas, siendo máxima cuando las vaquillonas se suplementaron dos veces al día ($P = 0,038$). Además hubo una tendencia de las vaquillonas suplementadas a tener una menor digestibilidad de la FAD de la dieta ($P = 0,096$) y una tendencia lineal decreciente conforme se incrementó la frecuencia de suministro del suplemento ($P = 0,093$; CUADRO III).

El consumo de N proveniente de la pastura y el N total fue similar en todos los tratamientos (CUADRO III). Las vaquillonas suplementadas excretaron más N en heces y tuvieron una menor digestibilidad de la PB de la dieta. No fueron detectadas diferencias significativas en la excreción de N en orina, ni en el balance de N (CUADRO III).

En el CUADRO IV se presentan los resultados relacionados con el comportamiento así como la tasa de ingestión total y de la pastura. Las vaquillonas T8 fueron observadas con mayor frecuencia comiendo, aunque solo se diferenciaron de T2.

CUADRO IV. Comportamiento y tasa de ingestión de vaquillonas no suplementadas o suplementadas con grano de maíz a razón de 1% del peso vivo (PV) a distintas frecuencias diarias

	Tratamientos ^a				EEM ^b	P-valor ^c		
	T0	T1	T2	T8		T	H	T × H
Proporción de las actividades en relación a las observaciones realizadas durante 12 hs								
Come	0,35 ^{ab}	0,32 ^a	0,37 ^{ab}	0,40 ^b	0,020	0,049	<0,01	0,670
Rumia	0,33	0,32	0,31	0,32	0,015	0,735	<0,01	0,187
Otros	0,32 ^{ab}	0,36 ^a	0,33 ^{ab}	0,28 ^b	0,017	0,018	<0,01	0,177
Tasa de ingestión promedio, g MS/hora								
Total	675	675	713	702	85,6	0,961	<0,01	0,041
Pastura	675	510	541	535	82,0	0,195	<0,01	0,784

^a Tratamientos: T0= pastura *ad libitum* sin suplementación; T1, T2, T3= pastura *ad libitum* y suplementación con grano de maíz a razón del 1% de su PV suministrado una, dos u ocho veces al día respectivamente.

^b Error estándar de la media (n=5 por tratamiento).

^c Nivel de significancia para la comparación de medias entre tratamientos, diferentes letras en superíndice en cursiva entre columnas indican diferencias significativas (*a, b*; $P \leq 0,05$) o tendencias (*x, y*; $0,05 < P < 0,10$).

Las vaquillonas de todos los tratamientos fueron observadas rumiando en aproximadamente un tercio del total de las observaciones realizadas y los tratamientos no afectaron significativamente esta variable.

La tasa de ingestión de la MS total y de la MS de la pastura fue similar entre tratamientos, pero hubo una fuerte interacción entre el tratamiento y la hora de observación (CUADRO IV), indicando una dinámica diferente entre tratamientos durante el día.

A continuación, en la FIGURA 1, se presenta la dinámica de ingestión de la MS total y de la MS de la pastura durante 12 horas de mediciones.

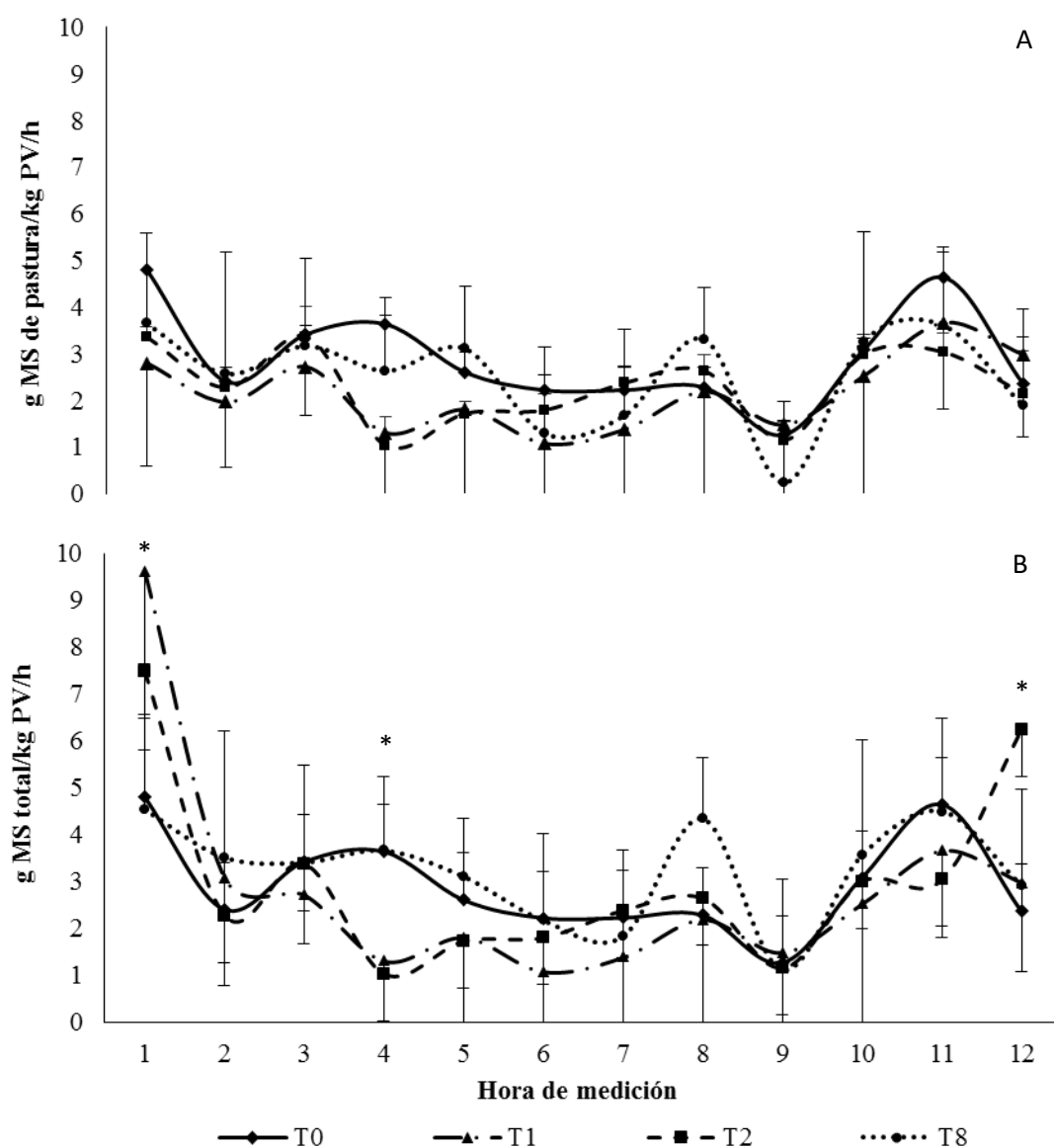


FIGURA 1. Ingestión de MS de la pastura (A) y MS total (B) de vaquillonas no suplementadas o suplementadas a diferentes frecuencias diarias con grano de maíz molido a razón de 1% del peso vivo (media \pm desvío estándar). * Indican diferencias ($p \leq 0,05$) entre tratamientos para cada hora.

En la hora 1 los tratamientos T1 y T2 tuvieron una tasa de ingestión de MS total superior a T0 y T8 (FIGURA 1 B). Esa mayor tasa de ingestión coincide con el acceso de las vaquillonas de T1 y T2 al 100 y 50 % del suplemento asignado respectivamente. Sin embargo la tasa de ingestión de MS de la pastura en esa misma hora fue similar en todos los tratamientos (FIGURA 1 A). En la hora 4 nuevamente se registran diferencias estadísticas en la tasa de ingestión de MS total de los T1 y T2 frente a T0 y T8. Tales diferencias obedecen a un descenso en la tasa de ingestión de los animales de T1 y T2 más que a cambios en la tasa de ingestión de T0 y T8 (FIGURA 1).

En el CUADRO V se presentan las medias para los parámetros ruminales obtenidos a partir del análisis de muestras de líquido ruminal de todas las vaquillonas y en la FIGURA 2, las dinámicas diarias de las concentraciones ruminales de AGV (A), N-NH₃ (B) y el pH (C).

CUADRO V. Media diaria de pH ruminal y concentraciones de N-NH₃ y AGV de vaquillonas no suplementadas o suplementadas con grano de maíz molido a razón de 1% del peso vivo (PV) a distintas frecuencias diarias

	Tratamientos ^a				EEM ^b	p- valor ^c		
	T0	T1	T2	T8		T	H	T × H
pH	6,41	6,40	6,36	6,43	0,040	0,939	<0,01	0,011
N- NH ₃ , mg/dL	4,63 ^a	3,79 ^a	3,32 ^b	3,50 ^b	0,403	0,023	<0,01	0,267
AGV ^d totales, mmol/L	142	136	130	125	6,028	0,140	0,048	0,243
AGV, mmol/mol								
Acetato	60,4 ^x	59,0 ^y	59,0 ^y	58,9 ^y	0,480	0,090	<0,01	0,350
Propionato	25,4	25,4	25,2	24,5	0,298	0,144	<0,01	0,943
Butirato	14,9	15,6	15,4	15,9	0,411	0,363	<0,01	0,236
Acetato: Propionato ^e	2,41	2,33	2,36	2,42	0,037	0,271	<0,01	0,927

^a Tratamientos: T0= pastura *ad libitum* sin suplementación; T1, T2, T8= pastura *ad libitum* y suplementación con grano de maíz a razón del 1% del PV en una vez, dos veces u ocho veces al día respectivamente.

^b Error estándar de la media (n= 5 por tratamiento).

^c Nivel de significancia para la comparación de medias entre tratamientos, diferentes letras en superíndice en cursiva entre columnas indican diferencias significativas (*a, b*; P≤0,05) o tendencias (*x, y*; 0,05<P< 0,10).

^d Ácidos grasos volátiles totales, como la suma de las concentraciones de acetato, propionato y butirato.

^e Relación entre la concentración de acetato/la concentración de propionato.

La suplementación y la frecuencia de suministro de concentrado no afectaron la media diaria del pH ruminal. Sin embargo se detectó efecto de la hora de muestreo y una fuerte interacción tratamiento por hora (CUADRO V), indicando que la dinámica diaria del pH ruminal fue diferente en los distintos tratamientos (FIGURA 2).

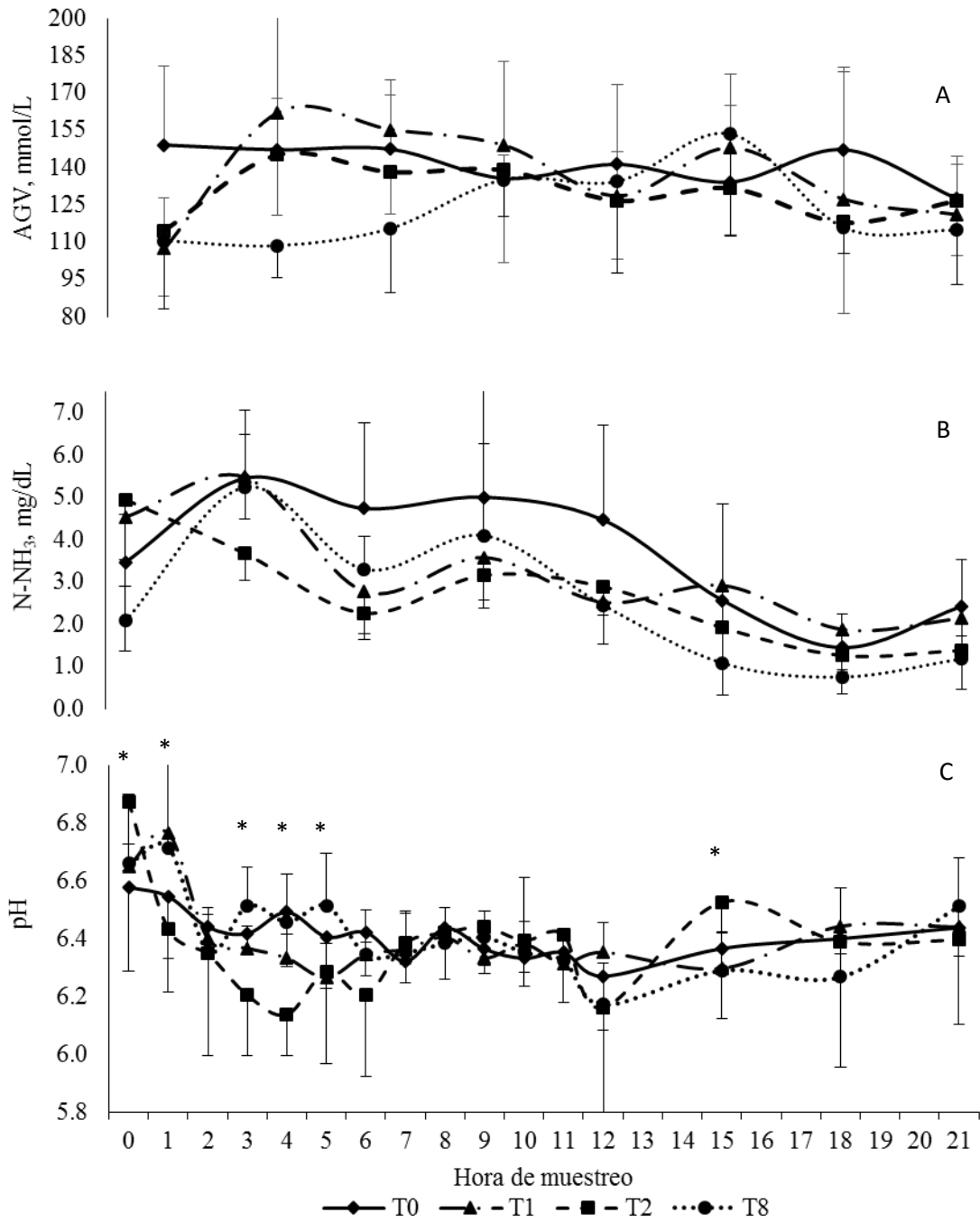


FIGURA 2. Concentración de AGV totales (A), N-NH₃ (B) y pH ruminal (C) de vaquillonas no suplementadas o suplementadas a diferentes frecuencias diarias con grano de maíz molido a razón de 1% del peso vivo (media ± DE). * Indican diferencias (p < 0,05) entre tratamientos para cada hora.

Las medias de pH ruminal se mantuvieron para todos los tratamientos en todos los horarios entre valores de 6,9 a 6,1 y solamente en T2 se observa un descenso de 0,9 puntos de pH entre las horas 0 y 5 de medición (FIGURA 2 C).

No hubo efecto de la suplementación sobre las concentraciones de AGV totales ni interacción tratamiento por hora. Tampoco hubo efecto de la suplementación ni de la frecuencia de suministro del maíz sobre las proporciones de ácidos grasos volátiles (acetato, propionato y butirato). Hubo una tendencia a presentar una menor proporción (60% vs. 59%) de acetato en las vaquillonas suplementadas sin embargo no afectó la relación acetato/propionato (CUADRO V).

Las concentraciones de N-NH₃, fueron más bajas en T2 y T8 en comparación con T1 y T0 (CUADRO V). Se registró además efecto de la hora de muestreo aunque no se detectó interacción tratamiento por hora (FIGURA 2 B).

10.2. EXPERIMENTO *in vitro*

10.2.1. Producción de gas *in vitro*

En el CUADRO VI se presentan los parámetros (*a*, *kd* y *Lag time*) obtenidos luego de ajustar los datos de volumen de producción de gas *in vitro* (mL/g MO incubada) a un modelo exponencial simple, tal como fuera descripto antes (ver punto 9.4.1).

La producción potencial de gas (*a*) y la tasa de producción de gas (*kd*) no fueron afectados por la suplementación ni por la frecuencia de suministro del suplemento (CUADRO VI). Únicamente se detectaron diferencias estadísticas significativas entre sustratos para estas variables.

CUADRO VI. Parámetros de producción de gas *in vitro* de inóculos ruminales de vaquillonas suplementadas o no con grano de maíz molido a razón de 1% del peso vivo (PV) a distintas frecuencias diarias

	Tratamientos ^a				EEM ^b	P-valor ^c		
	T0	T1	T2	T8		T	S	T×S
<i>a</i> ^d	218	217	219	230	40,0	0,36	< 0,01	0,60
<i>kd</i> ^e	5,0	5,7	5,5	4,6	0,45	0,45	0,05	0,27
<i>Lag time</i> ^f	---	---	---	---	1,06	< 0,01	0,01	< 0,01

^a Tratamientos: T0= pastura *ad libitum* sin suplementación; T1, T2, T8 = pastura *ad libitum* y suplementación con grano de maíz molido a razón de 1% del PV en una, dos u ocho veces al día respectivamente.

^b Error estándar de la media.

^c P-valor: T= efecto del tratamiento= efecto del sustrato; T×S= interacción tratamiento por sustrato.

^d Producción potencial de gas (mL/g MO incubada).

^e Tasa fraccional de producción de gas (h⁻¹).

^f *Lag time* es el tiempo de latencia en horas.

La frecuencia de suplementación sólo afectó el *Lag time* (P <0,01), y se detectó además para esta variable una fuerte interacción tratamientos por sustratos (P<0,01; CUADRO VI). Cuando se compararon los resultados entre tratamientos para cada sustrato por separado, sólo se observaron diferencias en el *Lag time* cuando el sustrato fue Raigrás. En este caso, el *Lag time* fue menor para T0, T1, T2 y mayor para T8 (0,0; 0,0; 1,2 y 2,6 h, respectivamente; P<0,05).

10.2.2. Digestibilidad verdadera *in vitro*

Cuando todos los datos fueron analizados en conjunto no se detectó efecto del tratamiento ni interacción entre tratamientos y sustratos incubados, aunque si un efecto muy marcado del sustrato ($P < 0,01$; datos no presentados).

En el CUADRO VII se presenta la digestibilidad verdadera *in vitro* de los sustratos incubados agrupados por tipo de alimento (granos, pasturas y henos) según cada tratamiento. Cuando los sustratos fueron agrupados y analizados según el tipo de alimento no se detectó efecto del tratamiento, el sustrato ni interacción entre ambos, a excepción del grupo de los henos, donde hubo efecto del sustrato (CUADRO VII). Dicho efecto estuvo dado por la baja digestibilidad *in vitro* de la MS del heno de paja de trigo que en promedio para todos los tratamientos fue de 20%.

CUADRO VII. Porcentaje de digestibilidad verdadera *in vitro* de inóculos ruminales de vaquillonas suplementadas o no con grano de maíz molido a razón de 1% del peso vivo (PV) a distintas frecuencias diarias

	Tratamientos ^a				EEM ^b	P- valor ^c		
	T0	T1	T2	T8		T	S	T × S
Granos de cereales ^d	89,8	90,3	91,3	91,2	1,91	0,941	0,070	0,965
Pasturas ^e	76,8	78,4	75,2	74,1	2,77	0,719	0,139	0,723
Henos ^f	29,1	28,4	31,6	32,0	2,69	0,723	<0,01	0,294

^a Tratamientos: T0= pastura *ad libitum* sin suplementación; T1, T2, T8 = pastura *ad libitum* y suplementación con grano de maíz molido a razón de 10 g/kg de PV en una, dos u ocho comidas al día respectivamente.

^b Error estándar de la media.

^c P- valor: T= efecto del tratamiento= efecto del sustrato; T×S= interacción tratamiento y sustrato.

^d Granos de cereales= grano seco de maíz, grano seco de sorgo, grano húmedo de sorgo.

^e Pasturas: alfalfa, trébol blanco, raigrás.

^f Heno de paja de trigo, heno de raigrás, heno de avena.

La digestibilidad de las pasturas, incluido el raigrás utilizado en el experimento *in vivo*, tuvieron una digestibilidad *in vitro* de la MS superior al 70%. No fueron detectadas diferencias entre sustratos a pesar de las diferencias en los tipos de pastura (gramíneos y leguminosos) y en la composición química (CUADRO II).

11. DISCUSIÓN

Tal como se esperaba, las vaquillonas suplementadas tuvieron un mayor consumo de MS y MO total. Este efecto ha sido reportado en trabajos previos, en los que se suplementó con concentrados energéticos a rumiantes con una dieta basada en pasturas templadas (Arelovich y col., 2003; Tebot y col., 2012; Aguerre y col., 2013). Sin embargo cuando se suplementa a rumiantes que consumen una dieta basada en una pastura de buena calidad, el aumento del consumo de MS total se produce a expensas de la reducción del consumo de MS de la pastura siendo esta respuesta denomina *adición con sustitución* (Bargo y col., 2003).

En este experimento sin embargo, hubo una respuesta aditiva en el consumo total de MS, es decir, los animales suplementados no solo consumieron una cantidad de forraje similar a la que consumieron las vaquillonas no suplementadas sino que además consumieron la totalidad del suplemento ofrecido (10 g/kg PV). Esta respuesta en el consumo total de MS, pudo estar dada al menos en parte, por las características de la pastura, ya que la misma tenía bajos niveles PB y altos niveles de FND (9% y 60% respectivamente; CUADRO I). Según algunos autores este tipo de respuestas, en la que la suplementación no produce sustitución de forraje por concentrado, se producen en situaciones en las que la pastura no es suficiente para satisfacer la capacidad de consumo de MS (Viglizzo, 1981) o cuando la calidad de la pastura es pobre (Bowman y Sanson 1996). Por el contrario, la tasa de sustitución de forraje por concentrado aumenta cuando mayor es la disponibilidad y la calidad de la pastura base (Faverdin 1991; Moore y col., 1999; Dixon y Stockdale, 1999; Bargo y col., 2003).

En este experimento, en el que el suministro de forraje fue *ad libitum* y no hubo pastoreo, es posible suponer que el consumo de MS de la pastura estuvo asociado a las características de composición química de la misma. Parece claro que el consumo de MS fue limitado por el llenado ruminal dado fundamentalmente por el consumo de fibra. En esta situación, la incorporación de grano de maíz en baja proporción (25% de la dieta; CUADRO III) no implicó un incremento del consumo de fibra y fue consumido fácilmente.

Otro aspecto que pudo ser determinante en la respuesta aditiva en el consumo total de MS, es el nivel de suplementación empleado en este trabajo (1% del PV en base fresca). Debido al elevado e inesperado nivel de humedad del grano de maíz (18%; CUADRO I), el nivel de suplementación fue de 0,7% del PV en base seca y puede ser considerado relativamente bajo ya que fue el 25 % de la MS consumida por las vaquillonas suplementadas (CUADRO III). A pesar de ello, en este experimento el nivel de inclusión de concentrado en la dieta fue de 33 g MS / kg PV^{0,75} (CUADRO III),

siendo superior a los 30 g de MS / kg PV ^{0.75} reportado en algunos trabajos, por encima del cual se produce una reducción del consumo de forraje (Horn y McCollum, 1987).

A pesar que las vaquillonas suplementadas tuvieron un mayor consumo de MS y MO, no hubo diferencias en el consumo cuando se incrementó la frecuencia de suministro del concentrado. Estos resultados no concuerdan con los reportados por Aronen (1991), que encontró en novillos suplementados con grano de cebada o grano de cebada y harina de remolacha un mayor consumo total de MS cuando ofreció el suplemento 2 vs. 1 vez al día. Tampoco concuerdan con los resultados obtenidos por Pulido y col. (2009) quienes reportan un descenso del consumo de MS cuando suplementó a vacas lecheras en ordeño más frecuentemente (0, 2, 3 o 4 veces/día). Estas discordancias en los resultados podrían estar dadas entre otras cosas por las diferencias en los forrajes utilizados en dichos experimentos. Mientras que en el trabajo de Aronen (1991) se utilizó ensilaje de pastura (24 % MS, 15 % PB, % de FND no reportado), en el experimento de Pulido y col. (2009) fue utilizado una pastura compuesta por raigrás perenne (16 % MS, 22 % PB, 51 % FND) que fue consumido por pastoreo directo. En ambos experimentos además el porcentaje de concentrado en la dieta fue superior al utilizado en este experimento (44% en Aronen, 1991 y 30% en Pulido y col., 2009).

Esta respuesta aditiva en el consumo de MS no puede ser atribuida únicamente a las características de la pastura y a los niveles de suplementación, otros factores como el comportamiento o el ritmo de ingestión también pudieron ser de importancia. En este sentido, la frecuencia de suplementación afectó el tiempo que los animales dedicaron a la ingesta, aunque solo se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre animales del tratamiento T1 y T8 (CUADRO IV). Este mayor tiempo dedicado a comer de los animales de T8 pudo deberse en parte a la mayor frecuencia de suministro del suplemento y al recambios de alimentos, que según algunos trabajos actúa como estímulo para la ingesta (Keskin y col., 2007). El mayor tiempo dedicado a comer, no se vio reflejado en un mayor consumo de MS (CUADRO III). Estos resultados difieren de los obtenidos por Pulido y col. (2009) quienes reportan un menor tiempo dedicado a la ingestión total (pasto + concentrado) cuando a las vacas en ordeño se les ofreció el suplemento más frecuentemente (4 veces/día).

Por otra parte, la ausencia de diferencias significativas en el tiempo dedicado a la rumia entre tratamientos, concuerda con la ausencia de diferencias significativas en el consumo total de FND y FAD entre tratamientos, siendo coherente además con el hecho que el tiempo de rumia guarda una estrecha relación con el consumo de fibra (Welch y Hooper, 1993).

A pesar de las características de la pastura utilizada en este experimento (discutidos más arriba), la digestibilidad aparente *in vivo* de la dieta fue para casi todas las fracciones superior al 70% (CUADRO III) y concuerda con reportes previos en los que se utilizaron pasturas similares en la misma estación del año (Santana, 2012; Félix, 2013).

La digestibilidad aparente *in vivo* de las distintas fracciones de la dieta no fueron afectadas por la suplementación ni por la frecuencia de suministro del concentrado (CUADRO III). La ausencia de efecto de la suplementación difiere de trabajos previos que reportan un incremento de la digestibilidad de la MS y MO total de la dieta cuando se incorporan granos de cereales a la dieta (Tebot y col., 2012). Según algunos autores (Dixon y Stockdale, 1999) dicho incremento se produce por un lado, como consecuencia del agregado de un alimento que usualmente tiene una mayor digestibilidad que las pasturas y por la sustitución parcial que frecuentemente ocurre del forraje por el concentrado (Dixon y Stockdale, 1999). Por otro lado, el incremento de la digestibilidad se produce como consecuencia de una actividad fermentativa ruminal más intensa que genera efectos asociativos que cuando son positivos, incrementan la digestibilidad y el consumo total de MS (Dixon y Stockdale, 1999).

También es reportada frecuentemente una menor digestibilidad de la fracción fibrosa de la dieta como consecuencia del agregado de carbohidratos de rápida fermentación (Dixon y Stockdale, 1999). A pesar de no detectar efecto de la suplementación ni de la frecuencia de suministro del concentrado sobre la digestibilidad aparente *in vivo* de las distintas fracciones de la dieta, hubo una tendencia lineal decreciente de la digestibilidad de la FAD conforme aumentó la frecuencia de suministro del concentrado ($p=0,093$; CUADRO III).

Podría relacionarse este hecho además con los resultados de la evaluación de la actividad fermentativa *in vitro* de los inóculos ruminales de los distintos tratamientos (punto 10.2.1). Los resultados de la producción de gas *in vitro* indican que la actividad fermentativa de los inóculos ruminales provenientes de las vaquillonas suplementadas más frecuentemente (T2 y T8) tuvieron un tiempo de latencia mayor cuando el sustrato incubado fue raigrás (CUADRO VI). Resultados similares fueron reportados por Aronen (1991), que en novillos de carne observó un mayor tiempo de latencia y una menor degradabilidad ruminal de los sustratos luego de 4 horas de incubación cuando los novillos fueron suplementados 2 vs. 1 vez al día (44% de concentrado en la dieta). Podría suponerse que el ingreso de carbohidratos de rápida fermentación de forma frecuente de alguna forma afecta negativamente la flora ruminal fibrolítica.

Sin embargo, los ligeros cambios encontrados en la digestibilidades de las distintas fracciones de la dieta son coherentes con los escasos efectos de la suplementación sobre el ambiente ruminal (CUADRO V). A pesar que hubo sobre el pH ruminal una fuerte interacción tratamiento por hora ($p=0,011$), indicando una dinámica diferente entre tratamientos, no hubieron diferencias significativas en la media diaria del pH ruminal (CUADRO V). El pH registrado en este experimento, se mantuvo a su vez en rangos óptimos para la digestión de la fibra (6,1 – 6,3; Calsamiglia y col., 2008). Resulta llamativo entonces la tendencia lineal decreciente de la digestibilidad de la FAD a medida que se incrementó la frecuencia de suplementación (CUADRO V). Es posible que esta tendencia al descenso de la digestibilidad de la FAD pueda estar relacionado con *el efecto carbohidrato* propuesto por Calsamiglia y col. (2008).

En este trabajo no se encontraron diferencias en las medias diarias de pH ni en la concentración de AGV en rumen entre animales suplementados a distintas frecuencias, pero tampoco entre estos y los no suplementados. Estos resultados difieren de los encontrados en trabajos previos en similares condiciones experimentales, en los que se reportan un menor pH ruminal en animales suplementados (Cajarville y col., 2006; Aguerre y col., 2013). Probablemente el tipo de pastura utilizado (alto contenido de fibra y bajo nivel de proteína bruta) pudo ser un factor fundamental sobre el ambiente ruminal, y probablemente explique las diferencias con dichos trabajos donde las pasturas se encontraban en estado vegetativo temprano y contenían menores niveles de fibra (18 % MS, 18 % PB, 42 % FND en Cajarville y col., 2006; 31 % MS, 13 % PB, 42 % FND en Aguerre y col., 2013).

En relación a la frecuencia de suministro del concentrado, los resultados de este trabajo concuerdan con reportes previos en los que no se detectaron cambios en las medias de la mayoría de los parámetros del ambiente ruminal evaluados (Aronen y col., 1991; Yang y Varga, 1989; Le Liboux y Peyraud, 1999). Sin embargo varios de estos trabajos reportan una mayor estabilidad del pH y de las concentraciones postprandiales de N-NH₃ cuando el suministro de alimentos fue dividido en más fracciones (Aronen, 1991; Robles y col., 2007; Soto-Navarro y col., 2008). Dichos resultados parecen ser coherentes con el hecho que la mayor frecuencia de suministro del concentrado implicará un menor consumo de concentrado en cada comida provocando un menor ingreso instantáneo de carbohidratos de rápida fermentación al rumen.

A la luz de los resultados obtenidos, en particular de las bajas concentraciones de N-NH₃ en rumen y de la excreción de N en orina, parecería que el metabolismo del N en este experimento estuvo caracterizado en todos los tratamientos por un importante reciclaje metabólico.

Las concentraciones de N-NH₃ a nivel ruminal fueron muy inferiores a las obtenidas en experimentos previos en los que se utilizó raigrás anual a inicios (30,7 mg/dL; Félix, 2013) y finales de primavera (19,9 mg/dL; Santana, 2012). Sin embargo Arelovich y col. (2003) utilizando vaquillonas de carne alimentadas en base a una pastura de Avena (28-30% de MS y 9,3-8,9% de PB) durante el periodo julio a setiembre, reportan concentraciones promedios de N-NH₃ ruminal de 2,92 mg/dL cuando no suplementaron y de 4,1 y 3,1 mg/dL cuando suplementaron con grano de maíz o gluten meal de maíz respectivamente. Siendo estas concentraciones similares a las encontradas en este experimento (CUADRO IV). Quizás los bajos niveles de fertilización y el avanzado estado fenológico de la pastura, no solo provocaron un bajo nivel de proteína en la dieta, sino que posiblemente también tenían un bajo contenido de nitrógeno degradable en rumen.

Se ha reportado que bajas concentraciones ruminales de N-NH₃ pueden limitar la actividad de la flora ruminal, en particular la actividad de la flora celulolítica (Delagarde y col., 1999) que es la que lo utiliza en mayor medida (Kozloski, 2011), produciéndose en consecuencia una menor degradabilidad ruminal de la fibra (Delagarde y col., 1999). Si bien varios trabajos reportan que la concentración máxima necesaria de N-NH₃ necesaria que maximizan la actividad de los microorganismos ruminales se encuentra en torno a 5 - 6 mg / dL (Bryant y Robinson, 1961). Algunos autores mencionan que el aumento de la concentración de N-NH₃ por encima de 5,0 mg N-NH₃/dL no incrementa la síntesis de proteína microbiana (SPM) y mencionan que la concentración de N-NH₃ limitante sea quizás en torno a 2,0 mg /dL (Satter y Slyter, 1974).

En este trabajo las concentraciones de N-NH₃ fueron relativamente bajas y coinciden con el balance negativo de nitrógeno degradable en rumen predicho por el modelo NRC (2000; ver CUADRO II en ANEXO II). Estos niveles de N en rumen pudieron ser limitantes para la correcta actividad fermentativa, sin embargo en base a las evaluaciones de la actividad fermentativa *in vitro* y considerando la elevada digestibilidad aparente *in vivo* de las distintas fracciones de la dieta no hay indicios claros que la misma hubiese sido afectada.

En particular, las concentraciones de N en orina fueron realmente bajas (1,4 g N/ Kg de orina, datos no presentados), siendo dichas concentraciones inferiores a la mitad de las concentraciones mínimas reportadas (Dijkstra y col., 2013). Según algunos trabajos, la principal vía de excreción de N en rumiantes es a través de la orina (Castillo y col., 2000; Calsamiglia y col., 2010; Dijkstra y col., 2013), no obstante en este trabajo la excreción de N en heces fue mayor. Tal vez esto haya sido el resultado de una pobre excreción urinaria de N, producto del bajo contenido de N de la dieta y el intenso reciclaje metabólico del mismo, más que a una mayor excreción de N en

heces. Ha sido reportado que la excreción de N en orina es mucho más variable que la excreción de N en heces (Dijkstra y col., 2013).

Por otra parte la excreción de N en heces en los tratamientos con suplementación fue mayor y se produjo un incremento cuadrático en la excreción de N en heces a medida que se incrementó la frecuencia de suministro del concentrado (CUADRO III). Esta mayor excreción estuvo dada probablemente por un mayor consumo de N de las vaquillonas suplementadas, que si bien tuvo un consumo medio numéricamente superior a las vaquillonas suplementadas no fue posibles detectar diferencias significativas (CUADRO III). La mayor ingestión de N estuvo dada por el N proveniente de grano de maíz, siendo el aporte de N de estos mayoritariamente proteína verdadera, que tiene a su vez una baja solubilidad y menor digestibilidad que la proveniente de las pasturas (NRC, 2000; McDonald y col., 2006; de Blas, 2010). Lo que explica la menor digestibilidad de la PB encontrado en las vaquillonas suplementadas y la mayor excreción fecal de N (CUADRO III).

12. CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos, podemos concluir que:

La suplementación incrementó el consumo total de MS y MO sin afectar la digestión ni el consumo de forraje.

Los resultados *in vivo* e *in vitro* de este experimento indican que el fraccionamiento de la suplementación con granos a niveles de suplementación cercanos a 1% del peso vivo sobre una pastura templada de mediana calidad no afecta el consumo, el comportamiento ingestivo ni el aprovechamiento digestivo de la dieta.

Implicancias de este trabajo:

Los resultados de este experimento no muestran evidencias que la suplementación de bovinos en torno al 1% de su peso vivo y con acceso a una pastura de calidad media sin restricciones en cantidad, produzca beneficios en el consumo de nutrientes o en el aprovechamiento digestivos-metabólicos al fraccionar el suministro de granos de cereales; por lo que en estas condiciones no sería necesario implementar un sistema de suplementación más complejo.

13. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. A.O.A.C. (1990). Official Methods of Analysis, 15th. ed. Arlington, USA, Ed. Association of Official Analytical Chemists.
2. Adams R.F., Jones R.L., Conway P.L. (1984). High-performance liquid chromatography of microbial acid metabolites. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 336:125–137.
3. 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. *Animal Feed Science and Technology*. 186:12–19.
4. Aguerre M., Repetto J.L., Pérez-Ruchel A., Mendoza A., Pinacchio G., Cajarville C. (2009). Rumen pH and NH₃-N concentration of sheep fed temperate pastures supplemented with sorghum grain. *South African Journal of Animal Science*. 40:246–250.
5. ANKOM In Vitro True Digestibility using the DAISYII Incubator. ANKOM Technology Method 3. Disponible en: http://ankom.com/media/documents/IVDMD_0805_D200.pdf. (consulta: 01/2015).
6. Arelovich H.M., Arzadún M.J., Laborde H.E., Vasquez M.G. (2003). Performance of beef cattle grazing oats supplemented with energy, escape protein or high quality hay. *Animal Feed Science and Technology*. 105:29–42.
7. Aronen I. (1991). Influence of frequency and accuracy of supplement feeding on rumen fermentation, feed intake, diet digestion and performance of growing cattle. 1. Studies with growing bulls fed grass silage *ad libitum*. *Animal Feed Science and Technology*. 34:49–65.
8. Bargo F., Muller L.D., Kolver E.S., Delahoy J.E. (2003). Invited review: Production and digestion of supplemented dairy cows on pasture. *Journal of Dairy Science*. 86:1–42.
9. Bowman J.G., Sanson D.W. (1996). Starch-or fiber-based energy supplements for grazing ruminants. *Proceeding Western Section American Society of Animal Science*. 47:118–135.
10. Britos A., Karlen M., Kelly G., Repetto J.L., Cajarville C. (2012). La suplementación de forrajes de alta calidad, ¿afecta el consumo y la digestibilidad de nutrientes? *Veterinaria (Montevideo)*. 48(1):138.
11. Bryant M.P., Robinson I.M. (1961). Studies on the nitrogen requirements of some ruminal cellulolytic bacteria. *Applied microbiology*. 9:96–103.

12. Cajarville C., Aguerre M., Repetto J.L. (2006). Rumen pH, NH₃-N concentration and forage degradation kinetics of cows grazing temperate pastures and supplemented with different sources of grain. *Animal Research*. 55:511–520.
13. Calsamiglia S., Cardozo P.W., Ferret A., Bach A. (2008). Changes in rumen microbial fermentation are due to a combined effect of type of diet and pH. *Journal of Animal Science*. 86:702–711.
14. Calsamiglia S., Ferret A., Reynolds C.K., Kristensen N.B., van Vuuren A.M. (2010). Strategies for optimizing nitrogen use by ruminants. *Animal*. 4:1184–1196.
15. Castillo A.R., Kebreab E., Beever D.E., France J. (2000). A review of efficiency of nitrogen utilisation in lactating dairy cows and its relationship with environmental pollution. *Journal of Animal and Feed Sciences*. 9:1–32.
16. Chase Jr. C.C., Hibberd C.A. (1989). Effect of level and frequency of maize supplementation on the utilization of low-quality grass hay by beef cows. *Animal Feed Science and Technology*. 24:129–139.
17. Chaves A.V. (2003). Digestion characteristics of forages, including perennial ryegrass at different stages of maturity, and supplementary feeding for dairy cows grazing pasture. Tesis doctoral. Massey University, Palmerston North, New Zealand. 272 pp.
18. Chilibruste P., Gibb M., Tamminga S. (2005). Pasture characteristics and animal performance. En: Dijkstra J., Forbes J., France J. *Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism* (2^a ed). Wallingford, CAB. Págs. 681–706.
19. de Blas C., Mateos G.G., García-Rebollar P. (2010). *Tablas FEDNA de composición y valor nutritivo de alimentos para la fabricación de piensos compuestos*. 3a ed. Madrid, España, Ed. Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal, 502 p.
20. Delagarde R., Peyraud J.L., Delaby L. (1997). The effect of nitrogen fertilization level and protein supplementation on herbage intake, feeding behaviour and digestion in grazing dairy cows. *Animal Feed Science and Technology*. 66:165–180.
21. Delagarde R., Peyraud J.L., Delaby L. (1999). Influence of carbohydrate or protein supplementation on intake, behaviour and digestion in dairy cows strip-grazing low-nitrogen fertilized perennial ryegrass. *Animal Research*. 48:81–96.
22. Dijkstra J., Oenema O., van Groenigen J.W., Spek J.W., van Vuuren A.M., Bannink A. (2013). Diet effects on urine composition of cattle and N₂O emissions. *Animal*. 7:292–302.

23. Dixon R.M., Stockdale C.R. (1999). Associative effects between forages and grains: consequences for feed utilisation. *Crop and Pasture Science*. 50:757–774.
24. Eastridge M.L., Firkins J.L. (2011). FEED INGREDIENTS| Feed Concentrates: Cereal Grains. En: Fuquay J.W. 2a ed. *Encyclopaedia of Dairy Sciences*, San Diego, EEUU, Ed. Academic Press, pp 335–341.
25. Farenzena R., Kozloski G.V., Mezzomo M.P., Fluck A.C. (2014). Forage degradability, rumen bacterial adherence and fibrolytic enzyme activity *in vitro*: effect of pH or glucose concentration. *The Journal of Agricultural Science*. 152:325–332.
26. Faverdin P., Dulphy J.P., Coulon J.B., Vérité R., Garel J.P., Rouel J., Marquis B. (1991). Substitution of roughage by concentrates for dairy cows. *Livestock Production Science*. 27:137–156.
27. 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, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay, 80 p.
28. Gibson J.P. (1981). The effects of feedings frequency on the growth and efficiency of food utilization of ruminants: an analysis of published results. *Animal Production*. 32:275–283.
29. Gibson J.P. (1984). The effects of frequency of feeding on milk production of dairy cattle: an analysis of published results. *Animal Production*. 38:181–189.
30. Hashem M.A. (2000). Frequency of feeding on growth and carcass characteristics of steers. *Asian Australasian Journal of Animal Sciences*. 13:425–426.
31. Hersom M.J. (2008). Opportunities to enhance performance and efficiency through nutrient synchrony in forage-fed ruminants. *Journal of Animal Science*. 86:E306–E317.
32. 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-Australasian Journal Animal Science*. 15:745–750.
33. Horn G.W., McCollum F.T. (1987). Energy supplementation of grazing ruminants. *Grazing Livestock Nutrition Conference*. 1:125–136.
34. Jung H.G., Allen M.S. (1995). Characteristics of plant cell walls affecting intake and digestibility of forages by ruminants. *Journal of Animal Science*. 73:2774–2790.

35. Keskin M., Gül S., Şahin A., Kaya S., Duru M., Görgülü Ö., Sahinler S., Biçer O. (2007). Effects of feed refreshing frequency on growth and carcass characteristics of Awassi lambs. *South Africa Journal Animal Science*. 37:248–255.
36. Kozloski G.V. (2011). *Bioquímica dos ruminantes*. 3a. ed. Santa Maria, Rio Grande do Sul, Ed. UFSM, 214 p.
37. Kozloski G.V., Cadorin Jr. R.L., Härter C.J., Oliveira L., Alves T.P., Mesquita F. R., Castagnino D.S. (2009). Effect of supplemental nitrogen source and feeding frequency on nutrient supply to lambs fed a kikuyu grass (*Pennisetum clandestinum*) hay-based diet. *Small Ruminant Research*. 81:112–118.
38. Le Liboux S., Peyraud J.L. (1999). Effect of forage particle size and feeding frequency on fermentation patterns and sites and extent of digestion in dairy cows fed mixed diets. *Animal Feed Science and Technology*. 76:297–319.
39. McDonald P., Edwards R.A., Greenhalgh J.F.D., Morgan C.A. (2006). *Nutrición animal*. 6a ed. Zaragoza, España, Ed. Acribia, 581 p.
40. Mertens D.R. (2003). Challenges in measuring insoluble dietary fiber. *Journal of Animal Science*. 81:3233–3249.
41. Moore J.E., Brant M.H., Kunkle W.E., Hopkins D.I. (1999). Effects of supplementation on voluntary forage intake, diet digestibility, and animal performance. *Journal of Animal Science*. 77:122–135.
42. Mould F.L., Ørskov E.R., Mann S.O. (1983). Associative effects of mixed feeds. I. Effects of type and level of supplementation and the influence of the rumen fluid pH on cellulolysis *in vivo* and dry matter digestion of various roughages. *Animal Feed Science and Technology*. 10:15–30.
43. NRC (2000). *Nutrient Requirements of Beef Cattle*. 7a ed. Washington, DC, EEUU, Ed. National Academy Press, 248 p. Software NRC para ganado de carne disponible en: <http://www.nap.edu/catalog/beefmodel/>
44. NRC (2001). *Nutrient requirements of dairy cattle*. 7a ed. Washington, DC, EEUU, Ed. National Academy Press, 408 p.
45. Pérez-Ruchel A. (2010). Tiempo y forma de acceso al forraje y uso de buffers o levaduras: Efecto sobre el aprovechamiento digestivo de la dieta en ovinos. Tesis de Maestría en Nutrición de Ruminantes, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República. Montevideo, Uruguay, 100 p.
46. Peyraud J.L., Astigarraga L. (1998). Review of the effect of nitrogen fertilization on the chemical composition, intake, digestion and nutritive value of fresh herbage: consequences on animal nutrition and N balance. *Animal Feed Science and Technology*. 72:235–259.

47. Pulido R.G., Muñoz R., Lemarie P., Wittwer F., Orellana P., Waghorn G.C. (2009). Impact of increasing grain feeding frequency on production of dairy cows grazing pasture. *Livestock Science*. 125:109–114.
48. Rearte D.H., Pieroni G.A. (2001). Supplementation of temperate pastures. *International Grassland Congress*. 19:679–689.
49. Reis R.A., Ruggieri A.C., Casagrande D.R., Páscoa A.G. (2009). Suplementação da dieta de bovinos de corte como estratégia do manejo das pastagens. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 38:147–159.
50. Reis R.B., Combs D.K. (2000). Effects of increasing levels of grain supplementation on rumen environment and lactation performance of dairy cows grazing grass-legume pasture. *Journal of Dairy Science*. 83:2888–2898.
51. Ribeiro Filho H.M.N.R., de Oliveira Junior, L.C.S., Dias K.M. (2012). Avaliação nutricional da polpa de maçã como suplementação energética para bovinos. *Ciência Rural*. 42:1627–1633.
52. Robles V., González L.A., Ferret A., Manteca X., Calsamiglia S. (2007). Effects of feeding frequency on intake, ruminal fermentation, and feeding behavior in heifers fed high-concentrate diets. *Journal of Animal Science*. 85:2538–2547.
53. Santana A. (2012). Inclusión de pasturas templadas en una dieta completa totalmente mezclada en vaquillonas. Tesis de Maestría en Nutrición de Rumiantes, Universidad de la República, Facultad de Veterinaria, Montevideo, Uruguay, 36 p.
54. SAS (2002). *Statistical Analysis Systems. Version 9*. SAS Institute, Cary, NC, USA.
55. Satter L.D., Slyter L.L. (1974). Effect of ammonia concentration on rumen microbial protein production *in vitro*. *British Journal of Nutrition*. 32:199–208.
56. Schutz J.S., Wagner J.J., Sharman E.D., Davis N.E., Engle T.E. (2011). Effect of feeding frequency on feedlot steer performance. *The Professional Animal Scientist*. 27:14–18.
57. UPIC (2004). Manejo nutricional en ganado de carne. Jornada Anual de la Unidad de Producción Intensiva de Carne. Paysandú, Uruguay, 19 p. Fecha consulta: 1/2015. Disponible en: <http://www.upic.com.uy/actividades.html>
58. Soto-Navarro S.A., Krehbiel C.R., Duff G.C., Galyean M.L., Brown M.S., Steiner R.L. (2000). Influence of feed intake fluctuation and frequency of feeding on nutrient digestion, digesta kinetics, and ruminal fermentation profiles in limit-fed steers. *Journal Animal Science*. 78:2215–2222.

59. 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. *Animal*. 6:617–623.
60. Van Soest P.J. (1994). *Nutritional ecology of the ruminant*. 2a ed. Ithaca, N.Y., EEUU, Ed. Cornell University Press, 476 p.
61. Viglizzo E.F. (1981). La suplementación de pasturas. En: Viglizzo E.F. *Dinámica de los sistemas pastoriles de producción lechera*. Buenos Aires, Argentina, Ed. Hemisferio Sur, pp 67–82.
62. Weatherburn M.W. (1967). Phenol–Hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Analytical Chemistry*. 39:971–974.
63. Welch J.G., Hooper A.P. (1993). Ingestión de alimentos y agua. En: Church, C.D. *El rumiante: fisiología digestiva y nutrición*. Zaragoza, España, Ed. Acribia, pp 117–126.
64. Williams B.A., Bosch M.W., Boer H., Verstegen M.W.A., Tamminga S. (2005). An *in vitro* batch culture method to assess potential fermentability of feed ingredients for monogastric diets. *Animal Feed Science and Technology*. 123:445–462.
65. Yang C.M., Varga G. (1989). Effect of three concentrate feeding frequencies on rumen protozoa, rumen digest kinetics, and milk yield in dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 72:950–957.

APÉNDICE

Publicación: Antúnez G., Cajarville C., Britos A., González A., Repetto J.L. (2014). Ruminant inoculum activity in cattle supplemented with corn grain at different daily frequencies: evaluation by *in vitro* gas production technique. *Animal Production Science*. 54:1662–1664. <http://dx.doi.org/10.1071/AN14378>

Ruminal inoculum activity in cattle supplemented with corn grain at different daily frequencies: evaluation using the *in vitro* gas-production technique

G. Antúnez^A, C. Cajarville^A, A. Britos^A, A. González^A and J. L. Repetto^{A,B}

^AUniversidad de la República, Lasplacas 1550, Montevideo, Uruguay.

^BCorresponding author. Email: joselorepetto@gmail.com

Abstract. The aim of this study was to evaluate the fermentation activity of ruminal inoculum from cattle fed fresh pasture and supplemented or not with corn grain at different daily frequencies. Twenty heifers with ruminal catheters were randomly assigned to four treatments. Animals were fed pasture *ad libitum* and non-supplemented (T0) or supplemented with corn grain at 1% of bodyweight offered in one (T1), two (T2) or eight (T8) meals per day. After 20 days of adaptation, ruminal inoculum of each heifer was used to evaluate fermentation activity by the *in vitro* gas-production technique, using alfalfa, white clover or ryegrass as substrates. Gas production was measured at 2, 4, 6, 8, 10, 12, 18, 24, 48, 72 and 96 h from the beginning of incubation. Data were fitted to an exponential model and potential gas volume, fractional rate of gas production and lag time were analysed by PROC MIXED, considering the effect of treatment and substrate, and their interaction. The three parameters were affected by the substrate. Supplementation frequency did not affect the potential gas volume or the fractional rate of gas production. An interaction between treatment and substrate was detected ($P < 0.01$) on lag time, but only when ryegrass was used as the substrate. In conclusion, increasing the frequency of supplementation did not show benefits for the fermentation activity of ruminal inoculum, at least when the type of pasture used in this experiment was supplemented with corn at 1% of bodyweight.

Additional keywords: forage, concentrate, ruminal fluid, supplementation frequency.

Received 14 March 2014, accepted 18 June 2014, published online 19 August 2014

Introduction

In temperate regions, ruminant supplementation with cereal grains is frequently used in pasture-based farms (Rearte and Pieroni 2001). This management increases animal performance independently of pasture seasonal fluctuations (Moore *et al.* 1999; Bargo *et al.* 2003), enhancing the stocking rate and improving the use of pasture (Reis *et al.* 2009).

However, negative associative effects were reported in pasture-based diets as a result of cereal grain incorporation, reducing the benefits of supplementation (Dixon and Stockdale 1999). These effects are related with sudden increases in volatile fatty acid production and perdurable falls of the ruminal pH, both associated with fast carbohydrate fermentation. This affects the number of ruminal fibrolytic microorganisms, their fermentative activity (Dixon and Stockdale 1999) and the digestibility of the fibre fraction in the diet (Mould *et al.* 1983), resulting in less pasture intake.

Increased feeding frequency was reported as a good strategy to enhance bodyweight (BW) gain (Gibson 1981) and milk solid production (Gibson 1984; Yang and Varga 1989). Studies evaluating supplementation of pasture-based diets reported an increase in DM intake (Aronen 1991), a decrease in N-NH₃ concentration (Yang and Varga 1989) and lower

ruminal pH fluctuations (Aronen 1991; Robles *et al.* 2007) with increased supplementation frequency. These changes were attributed to a more stable ruminal fermentative activity (Aronen 1991; Soto-Navarro *et al.* 2000; Robles *et al.* 2007), which reduces negative associative effects among pasture and supplements (Dixon and Stockdale 1999). The aim of the present study was to evaluate the fermentation activity (FA) of ruminal inoculum (RI) from cattle consuming fresh pasture as sole feed or supplemented with corn grain (CG) at different daily frequencies.

Materials and methods

Site and ethical approval

The experiment was conducted on the experimental farm of the Facultad de Veterinaria, Universidad de la República (34.41°S, 56.32°W). All procedures were approved by the Bioethics Committee of the Facultad de Veterinaria (protocols: CEUAFVET-PI 11).

Animals, feedstuffs and treatments

Twenty Hereford heifers (262 ± 33 kg BW) with ruminal catheters (5 × 110 mm) were allocated to metabolism cages.

Table 1. Chemical composition of feedstuffs offered to heifers and substrates incubated (mean \pm s.d.)

	DM	Organic matter	Crude protein	Neutral detergent fibre	Ether extract
<i>Feedstuffs offered to animals</i>					
Pasture ^A	22.7 \pm 2.4	90.0 \pm 0.5	9.2 \pm 1.2	60.4 \pm 4.6	–
Ground corn grain	82.2 \pm 0.1	98.5 \pm 0.1	7.9 \pm 0.0	17.4 \pm 3.6	4.0 \pm 0.3
<i>Substrates incubated</i>					
Alfalfa	19.4 \pm 0.1	90.9 \pm 0.0	20.6 \pm 0.6	32.8 \pm 0.3	3.5 \pm 0.0
Ryegrass	18.4 \pm 0.1	88.0 \pm 0.3	9.8 \pm 0.4	50.4 \pm 0.8	3.3 \pm 0.1
White clover	12.8 \pm 0.1	88.9 \pm 0.2	25.2 \pm 0.3	37.7 \pm 0.5	3.6 \pm 0.0

^AComprising ryegrass (*L. multiflorum*) 98.5% and white clover (*T. repens*) 1.5%.

Table 2. Effect of treatment on *in vitro* gas production parameters

T0 = pasture *ad libitum* non-supplementation; T1, T2, T8 = pasture *ad libitum* and supplementation with ground corn grain at 10 g/kg of BW in one, two or eight meals per day respectively. OM = organic matter. S = effect of substrate; T = effect of treatment; T \times S = interaction between treatment and substrate

Parameter	Symbol	Treatment			s.e.m.	P-value			
		T0	T1	T2		T8	T	S	T \times S
Potential gas production (mL/g of OM incubate)	<i>a</i>	218	217	219	230	40.0	0.36	<0.01	0.60
Fractional rate of gas production (per h)	<i>kd</i>	5.0	5.7	5.5	4.6	0.45	0.45	0.05	0.27
Lag time (h)	<i>L</i>	–	–	–	–	1.06	<0.01	0.01	<0.01

Heifers were blocked by BW and randomly assigned to one of four treatments ($n = 5$ per treatment). Animals were fed chopped fresh pasture (98.5% *Lolium multiflorum* and 1.5% *Trifolium repens*) *ad libitum* and non-supplemented (T0) or supplemented with corn grain at 10 g/kg BW offered in one (T1), two (T2) or eight (T8) meals per day (Table 1). Supplement was fed separately from forage at 0900 hours (T1), 0900 and 2100 hours (T2) and every 90 min from 0900 to 2100 hours (T8). Animals had free access to fresh water throughout the experiment. This study was part of a major experiment where several *in vivo* variables were measured (data not shown). Briefly, in order to put the present study into context: organic matter intake (g/kg BW) did not differ among supplemented animals (T1 = 32.1, T2 = 33.2, T8 = 33.9; $P > 0.05$) but it was different to that of the non-supplemented animals (T0 = 26.8; $P < 0.05$). With respect to rumen environment, neither pH nor volatile fatty acid concentration (VFA) differed among treatments ($P > 0.05$), and were on average 6.4 and 135 mM, respectively (data not shown).

Techniques and measurements

After 20 days of adaptation, RI was collected from each heifer to evaluate FA by the *in vitro* gas-production technique. The inoculum was collected at 1500 hours, 6 h after the beginning of the meal. At this time, the animals of T2 and T8 had consumed half of the daily CG assignments. The RI of each heifer was incubated in five fermentation flasks with an N-free medium (Williams *et al.* 2005), with each flask considered a replicate for each inoculum. Three flasks were incubated with 0.5 g (DM basis) of one of three forages (*Medicago sativa*, *T. repens* or *L. multiflorum*) and two flasks were incubated without substrate (blanks). Therefore, 25 flasks per treatment were incubated.

The flasks were saturated with CO₂, sealed with rubber stoppers and aluminium crimps and incubated at 39°C for

96 h. Gas-production measurements were performed using a digital manometer (RZ-6860–00, Cole-Parmer, Vernon Hills, IL, USA) and recorded at 2, 4, 6, 8, 10, 12, 18, 24, 48, 72 and 96 h from the beginning of incubation. Pressure values were transformed to volume by a regression equation ($R^2 = 0.998$) obtained in a previous experiment:

$$V = (4.4P) + (0.09P^2)$$

where V is gas volume (mL) and P is observed pressure (psi).

The volumes of gas obtained from each flask were adjusted to a simple exponential model with lag:

$$V = a[1 - e^{-kd(t-L)}]$$

where V is gas volume at time t (mL), a is potential gas production (mL/g OM incubate), kd is fractional rate of gas production (h) and L is lag time (h).

Statistical analyses

The parameters a , kd and L were analysed by PROC MIXED (SAS 2002), considering the effect of treatment (T), substrate (S), and the interaction between T and S using the model:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + S_j + (T \times S)_{ij} + \epsilon_{ijk}$$

Significance was declared when $P < 0.05$, and tendencies when $P < 0.10$.

Results and discussion

Neither supplementation nor the feeding frequency affected the volume or rate of gas production (Table 2). The differences observed for these variables corresponded to expected differences among substrates. The similar results of a and kd observed between treatments can be related to the

supplementation level used in this experiment (10 g/kg BW). Indeed, it has been reported that the decrease in ruminal pH induced by grain inclusion is related to the level of supplementation (Dixon and Stockdale 1999). In the present study no significant differences were found between treatments for ruminal pH (unpubl. data, see *Materials and methods*). In addition, the lack of difference could be related to the type of grain used, because corn decreases ruminal pH with less intensity than barley (Delahoy *et al.* 2003).

Supplementation frequency only affected *L* ($P < 0.01$), with a significant interaction among treatments and substrates for this variable. When each substrate was analysed separately, differences in *L* among treatments were observed only when ryegrass was used as substrate. In this case, *L* was lower for T0 and T1, followed by T2 and T8 (0.0, 0.0, 1.2 and 2.6 h, respectively; $P < 0.05$). The lower *L* for T0 could be related to a greater adaptation of rumen microorganisms to this substrate due to its similarity to the pasture consumed by the animals. The explanation of the lower *L* of T1 is not clear. Although it could be related to the time from the last meal of supplement (6 h for T1 and 0.75 h for T8), this is not consistent with the fact that the time from the last concentrate supply was the same for T1 and T2. Overall, the *in vitro* results indicate a low effect of increasing the supplementation frequency, at least at this level of supplementation.

Conclusions

Supplementation frequency did not affect the volume or rate of gas production, it only affected the *L* for one of the substrates incubated. At this supplementation level and when this type of supplement was used, increasing the frequency of supplementation did not show benefits for the fermentation activity of the RI.

Acknowledgements

This work was supported by the Proyecto de Iniciación a la Investigación 2013 de la Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC) de la Universidad de la República, República Oriental del Uruguay. Comisión Académica Posgrado (CAP; Beca de Apoyo Docente para estudios de Posgrado, 2013–2015) for the scholarship. We thank Mariana Cosío, Martín Aguerre and Sebastián Brambillasca for English revision, and Emilio Gutiérrez, Romina Rostagnol, Ignacio Saravia, Martín Guichón, Matías Garretano, Bruno Guidi and Luis Crucci for assistance with animal management and sampling contribution.

References

Aronen I (1991) Influence of frequency and accuracy of supplement feeding on rumen fermentation, feed intake, diet digestion and performance of

- growing cattle. 1. Studies with growing bulls fed grass silage ad libitum. *Animal Feed Science and Technology* **34**, 49–65. doi:10.1016/0377-8401(94)90191-0
- Bargo F, Muller LD, Kolver ES, Delahoy JE (2003) Production and digestion of supplemented dairy cows on pasture. *Journal of Dairy Science* **86**, 1–42. doi:10.3168/jds.S0022-0302(03)73581-4
- Delahoy JE, Muller LD, Bargo F, Cassidy TW, Holden LA (2003) Supplemental carbohydrate sources for lactating dairy cows on pasture. *Journal of Dairy Science* **86**, 906–915. doi:10.3168/jds.S0022-0302(03)73673-X
- Dixon DM, Stockdale CR (1999) Associative effects between forages and grains: consequences for feed utilisation. *Australian Journal of Agricultural Research* **50**, 757–774. doi:10.1071/AR98165
- Gibson JP (1981) The effects of feeding frequency on the growth and efficiency of food utilization of ruminants: an analysis of published results. *Animal Science* **32**, 275–283. doi:10.1017/S0003356100027173
- Gibson JP (1984) The effects of frequency of feeding on milk production of dairy cattle: an analysis of published results. *Animal Science* **38**, 181–189. doi:10.1017/S0003356100002178
- Moore JE, Brant MH, Kunkle WE, Hopkins DI (1999) Effects of supplementation on voluntary forage intake, diet digestibility, and animal performance. *Journal of Animal Science* **77**, 122–135.
- Mould FL, Ørskov ER, Mann SO (1983) Associative effects of mixed feeds. I. Effects of type and level of supplementation and the influence of the rumen fluid pH on cellulolysis *in vivo* and dry matter digestion of various roughages. *Animal Feed Science and Technology* **10**, 15–30. doi:10.1016/0377-8401(83)90003-2
- Rearte DH, Pieroni GA (2001) Supplementation of temperate pastures. In 'Proceedings of the international grassland congress'. pp. 679–689. (Sao Paulo, Brazil)
- Reis RA, Ruggieri AC, Casagrande DR, Páscoa AG (2009) Suplementação da dieta de bovinos de corte como estratégia do manejo das pastagens. *Revista Brasileira de Zootecnia* **38**, 147–159. doi:10.1590/S1516-35982009001300016
- Robles V, González LA, Ferret A, Manteca X, Calsamiglia S (2007) Effects of feeding frequency on intake, ruminal fermentation, and feeding behavior in heifers fed high-concentrate diets. *Journal of Animal Science* **85**, 2538–2547. doi:10.2527/jas.2006-739
- SAS (2002) 'Statistical analysis systems. Version 9.' (SAS Institute: Cary, NC)
- Soto-Navarro SA, Krehbiel CR, Duff GC, Galyean ML, Brown MS, Steiner RL (2000) Influence of feed intake fluctuation and frequency of feeding on nutrient digestion, digesta kinetics, and ruminal fermentation profiles in limit-fed steers. *Journal of Animal Science* **78**, 2215–2222.
- Williams BA, Bosch MW, Boer H, Verstegen MWA, Tamminga S (2005) An *in vitro* batch culture method to assess potential fermentability of feed ingredients for monogastric diets. *Animal Feed Science and Technology* **123–124**, 445–462. doi:10.1016/j.anifeedsci.2005.04.031
- Yang CMJ, Varga GA (1989) Effect of three concentrate feeding frequencies on rumen protozoa, rumen digesta kinetics, and milk yield in dairy cows. *Journal of Dairy Science* **72**, 950–957. doi:10.3168/jds.S0022-0302(89)79188-8

ANEXO I

CÁLCULO DE NUTRIENTES DIGESTIBLES TOTALES (NDT) SEGÚN NRC (2001):

$$\text{NDT (\%MS)} = \text{digCNF} + \text{digPB} + (\text{digAG} \times 2,25) + \text{digFND} - 7$$

Donde:

<i>digCNF</i>	Digestibilidad verdadera de carbohidratos no fibrosos	= 0,98(100-[(FND-PBIDN)+PB+EE+Cenizas]) × FAP
PBIDN	Proteína bruta insoluble en detergente neutro	= N insoluble en detergente neutro × 6,25
FAP	Factor de ajuste por procesado	= 1,0 para grano de maíz molido y forrajes según las recomendaciones de NRC, 2001.
<i>digPB</i>	Digestibilidad verdadera de la proteína bruta	forrajes = $PB \times \exp.[-1,2 \times (PBIDA/PB)]$ concentrados = $PB \times [1 \times (0,4 \times (PBIDA/PB))]$
PBIDA	Proteína bruta insoluble en detergente ácido	= N insoluble en detergente ácido × 6,25
<i>digAG</i>	Digestibilidad verdadera de los ácidos grasos (AG)	= AG. AG = EE - 1. Si el EE es <1, entonces AG = 0.
<i>digFND</i>	Digestibilidad verdadera de la fibra neutro detergente	= $0,75 \times (FNDn - \text{Lignina}) \times [1 - (\text{Lignina}/FNDn)^{0,667}]$
FNDn	Fibra neutro detergente libre de nitrógeno	= FND - PBIDN

ANEXO II

CÁLCULO DE REQUERIMIENTOS Y APORTES DE NUTRIENTES.

Fueron realizados en base al software NRC para ganado de carne (NRC, 2000), considerando las características de los animales, el ambiente y los alimentos que se detallan a continuación:

CUADRO I. Características de los animales, el ambiente, el manejo y los alimentos utilizadas para estimar el aporte, los requerimientos y el balance de nutrientes

Animales	Ambiente y el manejo			Alimentos		
					Pastura	Maíz
Raza	Hereford	Pastoreo (si o no)	No	%MS	24	82
Categoría	Vaquillona	Temperatura (°C)	20	%MO	10	2
Edad (meses)	18	Barro (cm)	0	%PB	9	7
Peso vivo ^a (kg)	253-256	Implantes o aditivos	No	%FND	53	10
Cond. Corporal ^b	5			%Lignina	10	2
Peso adulto (kg)	500			%EE	2	4
				%PDR ^c	80	43
				%PB soluble	35 ^d	11 ^e
				%NDT ^f	64	92

Las características no detalladas, no fueron modificadas y por tanto se utilizaron valores preestablecidos por el software NRC (2000). ^a Según el PV promedio de los animales de cada tratamiento (T0=254, T1=256, T2=255, T8=253). ^b Escala 1-9. ^c Datos proteína degradable en rumen fueron obtenidos de NRC, 2000. ^d Datos tomado de Santana, 2012. ^e Datos tomados de: de Blas y col., 2010. ^f Calculado según ANEXO I.

Los resultados obtenidos luego de estimar el aporte y los requerimientos en base al software NRC (2000) se presentan en el CUADRO I.

CUADRO II. Requerimiento de los animales, aportes de los alimentos, balance de energía neta (EN), proteína metabolizable (PM) y proteína degradable en rumen

	Tratamientos ^a			
	T0	T1	T2	T8
Consumo total real ^b , kg MS/d	6,725	7,850	8,200	8,300
Consumo estimado ^c , kg MS/d	6,900	6,800	6,800	6,700
Requerimientos EN total, Mcal/d	7,9	10,5	10,8	10,9
Aportes de EN total, Mcal/d	12,9	19,3	20,1	20,3
Balance, Mcal/d	5,0	8,7	9,3	9,4
Requerimientos de PM, g/d	511	698	721	730
Aportes de PM, g/d	461	640	663	670
Balance, g/d	-50	-59	-58	-60
Balance de proteína degradable en rumen, g/d	-84	-294	-298	-300
Ganancia diaria de PV estimada, kg/d	0,730	1,360	1,450	1,480

^a Tratamientos: T0= pastura *ad libitum* sin suplementación; T1, T2, T8 = pastura *ad libitum* y suplementación con grano de maíz molido a razón de 1% del PV en una, dos u ocho veces al día respectivamente. ^b Consumo de MS promedio de los animales de cada tratamiento (CUADRO III). ^c Estimado por el software NRC (2000).