



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Postgrado

EFECTO DE LOS SUPLEMENTOS RICOS EN ENERGÍA
SOBRE LA FUNCIÓN RUMINAL Y EL METABOLISMO DEL
NITRÓGENO EN OVINOS ALIMENTADOS CON FORRAJE
FRESCO

Dra. Islamey Tebot Leiras

Area Fisiología, Departamento de Fisiología,
Facultad de Veterinaria

TESIS DE MAESTRIA EN NUTRICION DE RUMIANTES

2008



**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA**

Programa de Postgrado

Efecto de los suplementos ricos en energía sobre la función ruminal y el metabolismo del nitrógeno en ovinos alimentados con forraje fresco

Dra. Islamey Tebot Leiras

Area Fisiología, Departamento de Fisiología,
Facultad de Veterinaria

Director de Tesis: Dr. Alberto Cirio
Co-directores: Dr. José Luis Repetto
Dra. Cecilia Cajarville

TESIS DE MAESTRIA EN NUTRICION DE RUMIANTES

2008

AGRADECIMIENTOS

A los Dres. Fernando Wittwer, Gilberto Kozloski y a la Ing. Agr. María del Jesús Marichal por haber aceptado ser integrantes de este Tribunal de Tesis. Es un gran honor para mí.

A mi tutor, Dr. Alberto Cirio, por su amistad, su confianza, su empuje en los momentos de flaqueza y el haber compartido conmigo su experiencia y excelencia académica durante todos estos años. Gracias, no lo hubiese logrado sin su tesón.

A los Dres. Cecilia Cajarville y José Luis Repetto, por haber aceptado ser los co-tutores de tesis, por los buenos y malos momentos vividos, por su apoyo logístico y humano tanto en el trabajo de campo como en la redacción de esta tesis.

A las ahora Dras. Victoria Elizondo, Ana Laura Falero y Alicia Pereira y los Bres. César Echaidés y Ana Secchi por su alegría, su esfuerzo, su compañía al momento de desarrollar el trabajo de campo y sus ocurrencias cuando nos ganaba el cansancio. Fue muy refrescante el haberlos tenido a mi lado. Gracias chicos!

A los Dres. Edgardo Rodas, Alejandro Benech, Vivian Lataste, Luis Cal y Juan Cruz, compañeros de interminables jornadas en el Campo Experimental, por su entusiasmo, su apoyo y sus consejos.

Al Dr. Ricardo Silva, por la invaluable ayuda al momento de hacer planillas y sus sugerencias en la redacción de esta tesis.

A la Tec. Laboratorista Cristina Nievas, por su sostén y amistad, por las innumerables muestras que procesó y por ayudarme a navegar por la bibliografía sin naufragar.

Al Dr. Bruno López y la Dra. Elena de Torres, a los funcionarios del Campo Nº 2 de Libertad por su disposición y ayuda en el desarrollo experimental de esta tesis.

A los Sres. León Fernández y Oscar "Canario" Méndez por su apoyo y ayuda, (pavada de jaulas te mandaste Canario)

A mis amigas María Laura e Inés por compartir mi vida en los más duros momentos, brindándome luz para continuar.

A mis Enana y Rita, silenciosas compañeras de largas horas frente a la computadora con sus hociquitos sobre mis piernas y el loco tambor de sus colas.

A Alfredo, por su paciencia y por salvarme cada vez que la computadora se enloquecía.

Dedico este trabajo a dos estrellas que me guían: Papá y Gaby quienes creyeron en mí y que siguen dándome fuerza para seguir adelante.

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de la suplementación energética y del tipo de suplemento sobre el aprovechamiento del nitrógeno de la dieta en ovinos alimentados con pasto fresco en dos estados vegetativos. 18 ovejas provistas de fístulas ruminales, catéteres yugulares y sondas vesicales alojadas en jaulas metabólicas se dividieron en 3 grupos (n = 6): F (forraje), FG (forraje 70% +grano 30%), FGM (forraje 70% +grano 15% +melaza 15%), durante 2 ensayos: E1 (forraje estado vegetativo tardío) y E2 (forraje estado vegetativo temprano). De las 4 comidas diarias (9, 13, 18 y 23 hs), se suplementaron la 1ª y la 3ª. Se determinó la digestibilidad de MS, MO, PB, FND, FAD, pH y N-NH₃ del líquido ruminal, eliminación urinaria de alantoína, producción de proteína microbiana y eficiencia de síntesis microbiana, uremia y manejo renal de la urea. La suplementación energética, sobre todo a base de grano solo, mejoró la digestibilidad de MS y MO en ambos ensayos independientemente de la calidad del forraje. Los valores de pH se mantuvieron dentro de rangos normales pero la adición de suplemento no aumentó la captación del N-NH₃. La suplementación energética no aportó mejoras importantes en la producción de proteína microbiana ni en la eficiencia de síntesis. No se encontraron reducciones en la uremia inherentes a la suplementación. En conclusión, la suplementación energética no influyó negativamente sobre la fermentación ruminal ni mejoró la utilización digestiva del nitrógeno.

Palabras clave: proteína microbiana, fermentación ruminal, suplementación energética, ovinos.

SUMMARY

The aim of this work was to determine the effect of energy supplementation and the type of supplement on nutritional nitrogen utilization in sheep consuming temperate fresh forage in two vegetative states. 18 ewes fitted with ruminal cannulas, jugular and bladder catheters housed in metabolic cages were randomly divided into 3 groups (n = 6) with different diets: F (forage), FG (forage 70% + grain 30%) and FGM (forage 70 % + grain 15% + molasse 15%), during 2 assays: E1 (forage in late vegetative state) and E2 (forage in early vegetative state). They received 4 daily-meals (9, 13, 18 and 23 h) the first and the last one were supplemented. Digestibilities of DM, OM, CP, FDN and FDA were determined; pH and N-NH₃ as well as urinary allantoin elimination, microbial protein production and efficiency of microbial protein synthesis, blood urea concentration and renal handling of urea were measured. Energy supplementation improved the DM and OM digestibilities in both assays independently of forage quality, especially when grain was used. pH values were within normal ranges but supplements did not increase N-NH₃ capture. Energy supplementation did not enhance both microbial protein production and the efficiency of microbial protein synthesis. There were not reductions on blood urea concentration related to supplementation. In conclusion, energy supplementation did not show negative effects on ruminal fermentation but did not improve the nitrogen digestive utilization.

Key words: microbial protein, ruminal fermentation, energy supplementation, sheep

TABLA DE CONTENIDOS

	Página
INTRODUCCION.....	2
El rumen como cámara de fermentación y su micropoblación	2
Los carbohidratos y su digestión.....	8
Metabolismo del nitrógeno en el rumen.....	14
Síntesis de proteína microbiana en el rumen y su eficiencia...	18
La suplementación energética.....	24
ANTECEDENTES.....	30
Valor nutricional del forraje como dieta base	30
Conveniencia de la suplementación.....	31
CARACTERIZACION DEL PROBLEMA.....	33
OBJETIVOS.....	34
MATERIALES Y METODOS.....	34
RESULTADOS	39
DISCUSION.....	44
CONCLUSION.....	51
BIBLIOGRAFIA.....	52

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

	Página
Tabla I: Características del retículo-rumen como cámara de fermentación.....	3
Tabla II: Localización y funciones de los microorganismos Ruminales.....	6
Tabla III: Clasificación de los CHO y su composición.....	8
Tabla IV: Absorción intestinal de aminoácidos en el rumiante.....	17
Tabla V: Composición química del alimento consumido durante los ensayos experimentales.....	35
Tabla VI: Composición química de cada dieta experimental para ambos ensayos experimentales.....	36
Tabla VII: Coeficientes de digestibilidad de MS, MO, PB, FAD, FND para los tres grupos experimentales en E1 y E2.....	40
Tabla VIII: Coeficientes de digestibilidad de MS, MO, PB, FAD, FND para los tres grupos experimentales para E1 y E2 tomados en conjunto.....	40
Tabla IX: Valores medios y rangos de pH ruminal para los tres grupos en E2.....	41
Tabla X: Valores medios de concentraciones de N-NH ₃ (mg/dl) en el líquido ruminal para los tres grupos experimentales.....	42
Tabla XI: Eliminación urinaria de alantoína (mmol/d), producción estimada de proteína microbiana (PM, g/d) y eficiencia de síntesis (ESM, g N/Kg de MODI, MODR) para los tres grupos en E1 y E2...	43
Tabla XII: Uremia y manejo renal de la urea en los tres grupos experimentales durante E1 y E2.....	43

	Página
Figura 1: Degradación de los CHO fibrosos y no fibrosos hasta sus productos terminales.....	12
Figura 2: Proceso de absorción de los ácidos grasos volátiles.....	13
Figura 3: Secuencia de eventos que lleva la adecuación del pH para optimizar la digestión de cada uno de los dos principales tipos de CHO de la alimentación del rumiante.....	27
Figura 4: Esquema del desarrollo temporal del protocolo Experimental.....	37
Figura 5: Evolución del pH medio para los tres grupos experimentales durante 24 h.....	41
Figura 6: Evolución de la concentración media de N-NH ₃ (mg/dl) para los tres grupos experimentales durante 24 h.....	42

Estudio Bibliográfico

INTRODUCCION

La búsqueda de la optimización de la interacción entre el rumiante y sus microorganismos ruminales, basada en la utilización por parte de éstos de los sustratos fermentables provenientes de los alimentos, hace pertinente el estudio del impacto que pueda tener sobre los procesos digestivos la suplementación energética de los animales alimentados con pasturas frescas.

La suplementación energética de dietas basadas en forrajes frescos ha resultado en un aumento del flujo de nitrógeno no amoniacal (NAN) hacia el duodeno, reduciendo las concentraciones de amoníaco ruminal y mejorando la performance del animal (van Vuuren et al., 1990). Por otra parte, también se ha mostrado que los suplementos conteniendo excesivas cantidades o tipos inapropiados de carbohidratos (CHO) pueden afectar negativamente la fermentación ruminal. Uno de los parámetros ruminales más afectados es el pH que se acidifica con el agregado de suplementos energéticos, disminuyendo la digestibilidad de la fibra por un efecto negativo sobre la flora celulolítica. Por tanto, si bien la suplementación energética es una herramienta atractiva en el manejo nutricional de los rumiantes, es importante determinar sus repercusiones sobre la función ruminal en general y el metabolismo del nitrógeno en particular.

En consecuencia, en la primera parte de esta tesis, nuestro estudio bibliográfico se abocará a un recuerdo fisiológico del funcionamiento ruminal, de las características de éste como cámara de fermentación y su micropoblación, para luego realizar una revisión de los sustratos utilizados por la población microbiana y su manejo dentro del rumen.

El rumen como cámara de fermentación y su micropoblación

“El rumiante puede ser considerado como una unidad de fermentación que colecta ella misma los sustratos a degradar, los transfiere a la cámara de fermentación, controla el tiempo de estadía, absorbe continuamente los productos terminales y los transforma en sustancias inmediatamente utilizables “ (Hungate ,1979)

El retículo-rumen es una gran bolsa donde los alimentos ingeridos son embebidos de líquido, mezclados con la digesta ya presente, repartidos según su densidad, y desplazados de manera organizada por contracciones coordinadas. Allí sufren una fermentación microbiana (sobretudo bacterias, protozoarios y hongos).

Se puede considerar al rumen como una enorme cámara de fermentación que presenta características fisicoquímicas especiales. Estas características son los factores primordiales para el desarrollo de la micropoblación ruminal. El contenido del retículo rumen presenta dos fases, una líquida que representa del 85-90% del mismo y una fase sólida de gran heterogeneidad dependiendo de la alimentación que reciban los animales.

En la Tabla I se resumen las características más sobresalientes que hacen del retículo-rumen una cámara de fermentación. Por otra parte, su

gran volumen (100-300 L en bovinos, 5-15 L en ovinos) hacen favorable los procesos digestivos llevado a cabo por la flora y fauna ruminal.

Tabla I: Características del retículo-rumen como cámara de fermentación

Propiedades	Mantenimiento / Regulación
1. Medio líquido (agua libre = 90%)	<ul style="list-style-type: none"> • Bebida • Salivación • Alimentos <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-left: 10px;"> $\left\{ \begin{array}{l} \text{bov} = 100-150 \text{ L/24 h} \\ \text{ov} = 10 - 15 \text{ L/24 h} \end{array} \right.$ </div>
2. Temperatura constante (39 - 41°C)	Metabolismo corporal + fermentación ruminal
3. Anaerobiosis casi completa	Flora epimural anaeróbica facultativa
4. pH regulado (5,5 a 7,2)	$\left. \begin{array}{l} \text{HCO}_3 \text{ y HPO}_4 \text{ saliva} \\ \text{Amoníaco} \end{array} \right\} \left\{ \begin{array}{l} \text{Ac. láctico} \\ \text{AGV y CO}_2 \end{array} \right.$
5. Entrada continua (substratos y m.o.)	Ingestión de tipo continuo + rumia
6. Eliminación continua de los productos de la fermentación	<ul style="list-style-type: none"> • Absorción (AGV, NH₃) • Eructación (CO₂ y CH₄) • Tránsito (alimento y m.o.) <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-left: 10px;"> $\left. \right\} + \text{cadenas simbióticas}$ </div>
7. Mezcla continua y tránsito lento	Motilidad general de los prestómagos

AGV = ácidos grasos volátiles

Para que la población microbiana lleve a cabo la fermentación de los sustratos el rumen debe mantener estas características de manera constante:

- Medio líquido: El agua del rumen surge de tres fuentes principales: la bebida, y la aportada por los alimentos. En esta fase líquida se encuentran partículas en suspensión (partículas alimenticias y microorganismos) y moléculas en solución (sales minerales y pequeñas moléculas orgánicas).
- Temperatura: Esta se encuentra alrededor de un 1° C más que la temperatura del animal. La temperatura puede fluctuar dependiendo de la magnitud de las fermentaciones ruminales y aumenta por ejemplo, durante la digestión de forrajes muy fermentescibles.
- Anaerobiosis casi completa: El potencial de oxidación-reducción es siempre netamente negativo en las condiciones de buen funcionamiento ruminal (-200 a -500 mV). Por su actividad, la flora epimural (ver página) mantiene un ambiente muy reductor y es capaz de hacer desaparecer rápidamente el oxígeno que difunde desde la sangre a la luz del órgano.
- pH: El pH ruminal resulta del equilibrio entre la producción de ácido y la capacidad tampón del medio ruminal. Si bien sufre variaciones a lo largo del día, en estrecha vinculación con la ingestión de alimentos, los datos relevados en la literatura indican que el *pH mínimo* compatible con el desarrollo equilibrado de los microorganismos, que

asegure una normal y correcta digestión del alimento, *oscila alrededor de $6,2 \pm 0,3$ (promedio diario)*. El rango más frecuente de variación, y que puede considerarse normal si ésta es de corta duración, se ubica entre 7,2 y 5,5.

- Proceso continuo de entrada y eliminación: dado por un lado por el aporte regular de nutrientes y agua provistos a la vez por la ingestión de alimentos y por la rumia. Y por el otro, eliminación de los productos del metabolismo, sea por absorción a través de la pared del rumen (AGV, amoníaco), por pasaje hacia la parte posterior del aparato digestivo de alimento y células microbianas (motricidad continua) y a través de la eructación (metano, gas carbónico).
- Mezcla continua y tránsito lento: las contracciones regulares de la pared y la rumia aseguran la mezcla del alimento y el tránsito lento favorece los procesos fermentativos.

Los constituyentes bióticos del ecosistema

La comunidad microbiana que habita el rumen se caracteriza por su alta densidad de población, amplia diversidad y complejidad de interacciones. Estos microorganismos viven en una estrecha relación simbiótica donde el hospedero les ofrece un nicho ambientalmente favorable, con un suministro continuo de alimentos y remoción de productos finales, mientras que los microorganismos proveen un servicio digestivo, que proporciona grandes cantidades de energía disponible que el animal hospedero no puede obtener a través de procesos digestivos propios (Calsamiglia et al., 2005). La mayoría de los microorganismos presentes en el rumen son anaeróbicos estrictos y los dos principales tipos son bacterias y protozoarios.

El número relativo de las diferentes especies dependerá de la composición y estructura de la dieta, así como de las diferentes interacciones entre ellas (Øskorv, 1992).

Las bacterias son la mayor y más diversa población microbiana que está presente en el rumen (Phillips & Gordon, 1995) y son responsables de la casi totalidad de las funciones vitales para el desarrollo del hospedero

La población bacteriana del rumen está comprendida entre 8×10^9 y 4×10^{10} células por ml de contenido. Constituyen alrededor del 50% de la biomasa microbiana y representa la categoría de microorganismo más compleja y más importante. Está compuesta esencialmente por bacterias anaerobias estrictas no esporuladas. Estas fueron descritas y clasificadas por Hungate (1966), sobre la base de la utilización de sustratos y productos finales producidos. Los principales grupos así definidos son: celulolíticos, hemicelulolíticos y pectinolíticos, amilolíticos, ureolíticos, metanogénicos, proteolíticos, productores de NH_3 .

De mayor utilidad para comprender los procesos fermentativos es la clasificación por su localización en el ambiente ruminal, que es la única que recordaremos aquí. En el rumen las bacterias ocupan 3 biotopos diferentes: se pueden encontrar adheridas a las partículas alimenticias (Solid Adherent

Bacterias, SAB), libres en el líquido ruminal (Liquid associated Bacterias, LAB) o fijadas a la pared interna del rumen (Flora epimural). (Cheng & Costerton, 1980).

Según Minato et al. (1966) alrededor de la mitad de la población bacteriana estaría adherida a las partículas vegetales, y para Fosberg & Lam (1977), el 75% del ATP microbiano detectado en el rumen estaría fijado a las partículas. Esta adhesión se hace sobre las paredes vegetales y sobre los tejidos celulósicos y concierne principalmente a las bacterias que degradan los polímeros parietales (celulolíticas). Las bacterias amilolíticas adhieren igualmente a los granos de almidón. La adhesión se hace por intermedio de un exopolisacárido llamado glicocalix que es sintetizado extracelularmente por exoenzimas bacterianas a partir de sustratos extrabacterianos.

Las LAB son bacterias de crecimiento rápido ya que utilizan sustratos solubles. Están rodeadas también por glicocalix (Cheng & Costerton, 1980). En ciertos casos esta estructura es muy compleja y muy extensa y las bacterias viven en el estado de colonia en su interior con células hermanas perfectamente idénticas. Este glicocalix podría tener un rol protector contra los bacteriófagos u otros agentes antibacterianos.

La flora epimural está fija sobre el epitelio escamoso estratificado de la pared de los preestomagos por intermedio del glicocalix. Son esencialmente diplococos, cocos y bacilos gram positivos y anaeróbicos facultativos, caracterizados por su fuerte actividad proteolítica y ureolítica. Esta población bacteriana parece ser más independiente de la naturaleza de la alimentación que la población libre. El rol jugado por estas bacterias es muy importante y sus funciones principales son: 1) Hidrolizar la urea que difunde a través de la pared del rumen o que proviene de la saliva hasta amoníaco, 2) Degradar las células epiteliales fuertemente queratinizadas provenientes de la descamación de la mucosa ruminal, lo que permite aprovechar las proteínas casi insolubles como la queratina 3) Al ser anaerobias facultativas son capaces de metabolizar el oxígeno que difunde a través de la pared del rumen desde la sangre, impidiendo que difunda hacia la luz del órgano.

Los protozoarios del rumen son esencialmente ciliados (muy escaso flagelados). Su número no excede generalmente 2 a 5 x 10⁶ organismos por ml de contenido de rumen (Hungate, 1966) y constituyen el 50% de la biomasa microbiana del rumen por su tamaño mayor que el de las bacterias. Están generalmente libres en el líquido ruminal, pero algunos se fijan igualmente a las partículas vegetales. Los ciliados son capaces de transformar un gran número de constituyentes alimentarios y bacterianos en metabolitos y en compuestos celulares que serán rápidamente utilizados por el rumiante. La importancia de esta actividad es sin embargo todavía muy controvertida, ya que en ausencia de protozoarios la fermentación bacteriana continúa siendo eficaz. Utilizan los glúcidos solubles y son también proteolíticos. Una población abundante de protozoarios está frecuentemente asociada a una concentración aumentada de amoníaco en el rumen y sus necesidades de nitrógeno están en gran parte cubiertas por la ingestión de bacterias.

Otros *microorganismos* de menor importancia (hongos, micoplasmas, bacteriofagos) no serán descritos en esta revisión.

En la Tabla II se resumen la localización y las principales funciones de la micropoblación ruminal.

Tabla II: Localización y funciones de los microorganismos ruminales

<i>TIPO</i>	<i>LOCALIZACION</i>	<i>FUNCIONES</i>
Bacterias	Libres: LAB	<ul style="list-style-type: none"> • degradan gran variedad de sustratos libres • síntesis de vitaminas
	Adherentes a partículas alimentarias: SAB	<ul style="list-style-type: none"> • degradan celulosa y almidón • proteolisis • síntesis de vitaminas
	Fijas a las paredes ruminales: flora epimural	<ul style="list-style-type: none"> • ureolisis • proteolisis parietal • captación de O₂
Protozoarios	Libres (transitoriamente fijos)	<ul style="list-style-type: none"> • proteolisis • stock de glúcidos • fagocitosis de bacterias • desagregación mecánica
Hongos y levaduras	Adherentes a partículas alimentarias	<ul style="list-style-type: none"> • degradan glúcidos y proteínas • desagregación mecánica • síntesis de vitaminas
Bacteriófagos	Intrabacterianos	<ul style="list-style-type: none"> • lisis bacteriana

Interrelaciones entre los microorganismos

Todos los microorganismos presentes en el ecosistema ruminal se interrelacionan entre ellos para maximizar la fermentación del alimento (Van Soest, 1982). Desde el punto de vista de su nutrición podemos establecer dos tipos de microorganismos: los que fermentan los alimentos y aquellos que fermentan los productos de fermentación de los primeros. Esta segunda población tiene especial importancia en la eliminación de los productos finales de la fermentación y de forma indirecta les proporciona a los fermentadores de alimento sustancias para su desarrollo. Un ejemplo de ello son los ácidos grasos volátiles ramificados que son producidos por las bacterias amilolíticas, que son utilizados por las bacterias celulolíticas para la síntesis de aminoácidos.

De la degradación de los alimentos, los microorganismos obtienen energía y materia prima (aminoácidos, amoníaco, esqueletos carbonados, azufre) para sintetizar sus propias proteínas que aseguren su crecimiento y reproducción. Esta proteína microbiana, de mayor valor biológico que la proteína vegetal, será la que finalmente degrada y absorba el rumiante.

Esto hace que no sea tan importante la calidad de la proteína que se suministra al animal dado que no se registran en la práctica deficiencias de aminoácidos esenciales, pues éstos son sintetizados por las bacterias. Esto

permite usar fuentes de nitrógeno muy económicas (urea, biuret) para satisfacer los requerimientos en proteína del rumiante. También se sintetizan en el rumen todas las vitaminas del grupo B y la K, haciendo al animal independiente de su aporte por la dieta

Efecto de la dieta sobre las poblaciones microbianas

El perfil de fermentación ruminal estará determinado por el tipo y las proporciones de la población microbiana (Yokohama & Johnson, 1988). Es aquí donde la dieta tiene su incidencia más importante. Este perfil se verá modificado dependiendo si la dieta es forrajera o por el contrario rica en concentrados.

Si la dieta es forrajera predominará una flora fibrolítica mientras que si es rica en concentrados y con bajos niveles de fibra se favorecerá la instalación de una flora amilolítica. (Mc Allister et al., 1993). Las dietas ricas en carbohidratos son altamente digestibles con formación muy rápida de grandes cantidades de AGV. Esta producción excesiva tiene por consecuencia una disminución del pH ruminal con reducción de las poblaciones celulolíticas y metanogénicas (Van Soest, 1982).

En resumen, las poblaciones microbianas necesitan, para su mantenimiento y crecimiento, tanto energía (provista por los CHO) así como nitrógeno (N). Estos dos sustratos principales serán suministrados por la dieta y de esta forma dependiendo del predominio de uno de ellos se determinará el perfil del ecosistema ruminal.

Carbohidratos y su digestión

Los carbohidratos (CHO) de la dieta

Los CHO son la más importante fuente de energía para los microorganismos ruminales (Hungate, 1966) y el componente cuantitativamente más importante de la dieta de los rumiantes. Los productos terminales de su digestión son los principales proveedores de glucosa y ácidos grasos en el metabolismo intermediario.

Desde el punto de vista físico-químico, los CHO se dividen en estructurales (componentes de la pared celular, donde se incluye la celulosa, hemicelulosa y la pectina) y no estructurales (no forman parte de la pared celular, compuesto por azúcares simples, hidratos de carbono de reserva (almidón) y ácidos orgánicos).

Desde el punto de vista nutricional, se pueden clasificar en fibrosos y no fibrosos o solubles (Tabla III)

Tabla III. Clasificación de los CHO y su composición (adaptado de Van Soest, 1982).

Carbohidratos	Composición
No fibrosos	
Azúcares solubles	Mono y di-sacáridos
CHO de reserva	
Almidón	Polímero de glucosa unidas por enlaces α 1-4, α 1-6
Fructosanos	Polímero de fructosa
Levanos	Enlaces β 2-6(forrajes verdes y granos de cereal)
Inulinas	Enlaces β 2-1 (tubérculos)
Pectinas	Acido galacturónico, arabinosa, galactosa
Acidos orgánicos	Productos de fermentación de otros CHO (ensilados)
Fibrosos	
Celulosa	Polímero de glucosa unidas por enlaces β 1-4
Hemicelulosa	Xilanos, glucosa, arabinosa, manosa, galactosa, ác. galacturónico
Lignina	Polímero fenólico unidos por enlaces cruzados muy complejos

Los *CHO no fibrosos* por su alta solubilidad son fermentados rápidamente en el rumen. Incrementan la densidad energética de la dieta, lo cual mejora el aporte de energía para los microorganismos.

Los azúcares solubles, sólo son abundantes por períodos cortos después de la ingestión de los alimentos ya que son rápidamente utilizados por los microorganismos como fuente de energía. El almidón y los fructosanos son degradados eficientemente por las bacterias amilolíticas, siendo el propionato el principal producto de la fermentación. Hay gran número de especies bacterianas que poseen actividad amilolítica, y su degradación comenzará por la adhesión del microorganismo al sustrato. Las pectinas forman parte de la pared celular, tienen un perfil de fermentación similar al almidón con una degradabilidad ruminal cercana al 100% (Nocek & Tamminga, 1991) pero a diferencia de los almidones su principal producto de fermentación es el acetato.

Los CHO fibrosos, por estar menos hidratados y ser menos solubles, son más resistentes a la degradación, estimulan la rumia y aumentan la producción de saliva que actúa como tampón ruminal. Tienen menor concentración energética y pueden limitar la ingestión.

La fibra vegetal está constituida por CHO estructurales de las plantas y es un agregado de componentes que no constituyen una entidad propia, pero que se entrelazan formando una misma macromolécula (Chesson & Forsberg, 1988). Las microfibrillas de la celulosa, componente mayoritario de la pared, forman un entramado tridimensional, sobre una masa amorfa compuesta por hemicelulosa, pectina y lignina, y a la que frecuentemente se le asocian minerales y otros componentes. La lignina no es un carbohidrato, es un polímero fenólico localizado en la pared celular secundaria (Cheng et al., 1991), pero se engloba dentro de este concepto por su estrecha relación con los CHO estructurales.

Bajo el concepto de fibra se agrupan los componentes de la pared celular. Los análisis que se utilizan en la actualidad son los propuestos por Van Soest (1982) y permiten separar el contenido celular de la pared celular; a esta última se la particiona en tres fracciones: Fibra detergente neutro (FDN), Fibra detergente ácido (FDA) y Lignina detergente ácido (LDA).

* Fibra Detergente Neutro (FDN): Es la fibra que queda luego de hervir al forraje en una solución de detergente neutro (sulfato lauril-sódico y ácido etilen-di-amino-tetra-acético, EDTA). En el tratamiento todo el contenido celular se disuelve y queda lo correspondiente a la pared celular (celulosa, hemicelulosa y lignina). El contenido de FDN se expresa en porcentaje del total de materia seca y la misma se correlaciona inversamente con el consumo voluntario de MS.

* Fibra Detergente Ácido (FDA): Es el residuo que queda luego de someter a la fibra detergente neutro a una solución de detergente ácido (ácido sulfúrico y bromuro de acetiltrimetilamonio). En este proceso se extrae la hemicelulosa, de tal forma que la fibra remanente estará constituida por celulosa y lignina. Al igual que FDN, los resultados se deben expresar en porcentaje de la materia seca evaluada.

* Lignina Detergente Ácido (LDA): Es el residuo que queda al exponer la fibra en detergente ácido a una solución de ácido sulfúrico. Al igual que los casos anteriores, el resultado se expresa en porcentaje de LDA con respecto a la materia seca analizada.

La digestibilidad de un forraje estará dada en función de la cantidad y calidad de fibra que posea. Así, a mayor contenido de fibra y a menor calidad de la misma, menor será la digestibilidad del forraje. Por lo general, cuanto mayor sea el contenido de FDN (pared celular) de un forraje menor será su digestibilidad. Pero esto no siempre es así ya que la digestibilidad de la pared celular dependerá del grado de lignificación de la misma. De tal forma que su digestibilidad estará determinada por la cantidad de FDA y de

LDA que posea. A mayor fibra en detergente ácido y a mayor lignina, menor será la digestibilidad del material.

De todas formas cabe aclarar que para que se cumplan correctamente las funciones gastrointestinales será indispensable que la dieta posea por lo menos un mínimo de fibra. En caso contrario el animal sufrirá un cuadro de acidosis (por exceso de producción de ácido propiónico y ácido láctico a partir de los CHO solubles) con trastornos digestivos, mal aprovechamiento del forraje ingerido, decaimiento y merma en la producción. Pero si la fibra, es de calidad, con bajos porcentaje de FDA y LDA, será más aprovechable por parte del animal y más beneficioso para la producción.

Fermentación de los CHO en el rumen

El metabolismo de los CHO por los microorganismos del rumen determina la producción de AGV que proporcionan el 70 a 80% de las necesidades calóricas totales del animal. La mayoría de los CHO consumidos por los rumiantes son polímeros de la glucosa. Cuando los CHO (fibrosos y no fibrosos) se exponen al ataque microbiano experimentan, en primer lugar una fase de hidrólisis que los degrada en sus componentes monosacáridos y posteriormente, la conversión de éstos en fructosa-1,6 difosfato (Figura 1).

Esto se logra por medio de la glucosa en los casos del almidón y la celulosa, por medio de la fructosa en el caso de los fructosanos y por medio de la xilosa en los casos de las hemicelulosas y las pectinas.

Posteriormente, sigue una fase fermentativa (vía glicolítica de Embden-Meyerhof) para la oxidación anaerobia de fructosa-1,6 difosfato a piruvato por medio del fosfoenolpiruvato. En una tercera etapa, que abarca las reacciones que producen los metabolitos finales de la fermentación, se forman los ácidos grasos volátiles, principalmente acetato, propionato y butirato. El piruvato es el compuesto intermedio a través del cual deben pasar todos los CHO antes de ser transformados en AGV, CO₂, y CH₄. La proporción de cada producto final dependerá del tipo de CHO fermentado, de las especies bacterianas que intervienen y del ambiente en el rumen durante la fermentación.

La síntesis de compuestos microbianos, en especial la formación de aminoácidos se lleva a cabo mediante el uso de intermediarios de las etapas anteriores, acoplados a la transaminación.

Fermentación de los CHO no fibrosos

El almidón es hidrolizado hasta glucosa en el rumen por la acción de amilasas y otras carbohidrasas extracelulares o asociadas a la pared bacteriana, producida por cepas amilolíticas, algunas de las cuales son capaces de realizar las cuatro etapas de la fermentación. Los microorganismos amilolíticos dan lugar a una proporción más elevada de ácido propiónico (35-45 mol/100 mol AGV) en el rumen que los que fermentan celulosa o hemicelulosa (15-25 mol/100 mol AGV). La formación de propiónico, a partir de piruvato, puede realizarse a través de dos vías metabólicas: vía succinato o vía lactato. La primera de ellas es la más importante en condiciones standard de alimentación, mientras que la

segunda, un 50% menos eficaz desde el punto de vista energético, sólo es predominante cuando los animales consumen dietas con altos niveles de concentrados. En estas condiciones, el ácido láctico se acumula en el rumen como consecuencia de un desequilibrio entre las bacterias que producen y las que utilizan el ácido láctico. La acumulación de lactato hace que disminuya el pH del rumen y favorece el crecimiento de las bacterias acidotolerantes y los lactobacilos.

Fermentación de los CHO fibrosos

La fibra se degrada lentamente, por lo que la adhesión de los microorganismos a la pared celular es el primer paso para comenzar su degradación. Esta adhesión puede ser vía uniones específicas a través de moléculas de la superficie bacteriana que se une a receptores de la fibra (adhesinas) o uniones inespecíficas con enlaces iónicos (Chesson & Forsberg, 1988). Los primeros puntos de adhesión se localizan en los bordes de las partículas, en lesiones superficiales o en los estomas. El proceso de degradación va de dentro hacia afuera debido a que la superficie externa de las plantas suele estar recubierta por lignina, taninos, cutina y sílice que dificultan el ataque microbiano.

Las bacterias son las primeras en colonizar la estructura vegetal, y luego de ellas se producirá la colonización por protozoarios y hongos, estos últimos facilitan la adhesión bacteriana ya que son los únicos que pueden penetrar la lignina, proporcionando nuevos sitios para la acción de las enzimas bacterianas (Ho et al., 1988). Una vez adheridos, se produce la degradación enzimática descrita en la Figura 1. La actividad celulolítica se realiza a través de un complejo enzimático que consta de tres enzimas (endooglucanasa, celobiohidrolasa y β -glucosidasa) que trabajan sinérgicamente.

En la degradación de los CHO no sólo existen sinergismos a nivel enzimático, sino que también son importantes las interacciones entre grupos bacterianos (celulolíticos y no celulolíticos). Las bacterias no celulolíticas degradan los productos de fermentación de la celulosa (celobiosa y celodextrina) y aceleran el proceso digestivo de la celulosa. Esta interacción se ve también en la degradación de la hemicelulosa que es primero solubilizada por microorganismos no utilizadores de hemicelulosa para luego los polisacáridos solubles ser fermentados por bacterias que los pueden utilizar (Fondevila & Dehority, 1994).

El grado de degradación ruminal de la fibra dependerá de la proporción de los componentes de la dieta siendo afectada por factores asociados a los microorganismos (accesibilidad de éstos al sustrato, densidad y actividad de las poblaciones fibrolíticas) y al animal (masticación, salivación, cinética ruminal)

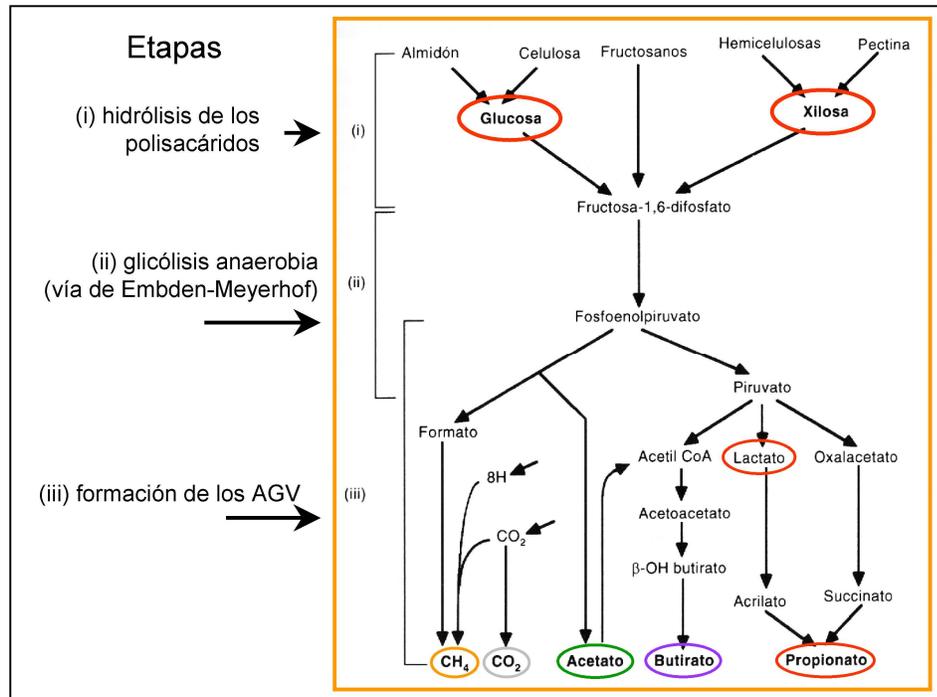


Figura 1: Degradación de los CHO fibrosos y no fibrosos hasta sus productos terminales (según Leek, 1999)

La absorción de los AGV: su autorregulación por el pH

De los productos terminales de la digestión ruminal de los polisacáridos, el CO₂ y el metano se eliminan al exterior con la eructación. Los AGV se absorben casi enteramente a través de la pared de los prestómagos, en forma pasiva, respondiendo a un gradiente de concentración entre la luz ruminal y la sangre. El principal factor regulador de esta absorción es el pH. Cuando el pH del medio ruminal se encuentra por encima del pK (pH al cual el 50% del ácido se encuentra disociado y el otro 50% no disociado) de los AGV (= 4,8) predomina la forma disociada del ácido (tiende a ceder hidrogeniones al medio), forma en la que es hidrosoluble y se absorbe mal. Cuando el pH es inferior al pK del AGV predomina la forma no disociada del ácido (tiende a captar hidrogeniones), forma en la cual es liposoluble, se solubiliza fácilmente en la membrana celular lipoproteica y se absorbe a velocidades mucho mayores. Esta absorción hace que se retiren hidrogeniones del medio ruminal, con lo que su pH se eleva y la absorción de AGV se frena. Existe así una verdadera autorregulación del proceso a través del pH ruminal. En condiciones normales éste nunca se encuentra por debajo del pK de los AGV, pero su efecto regulador del equilibrio entre los estados disociado y no disociado igual es efectivo para modular la absorción de los AGV. En la Figura 2 se muestra con mayor detalle el proceso de absorción de los AGV. De ella se desprende que una reducción de la absorción de los AGV, por la causa que sea, hará bajar el pH ruminal por dos motivos: la acumulación ruminal de ácidos y la disminución del ingreso de bicarbonato al rumen.

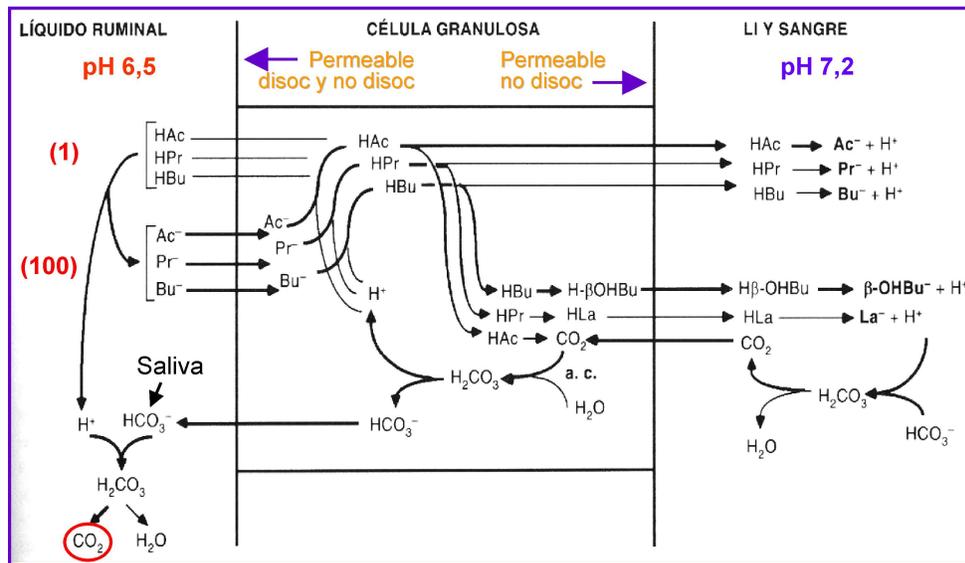


Figura 2. En el líquido ruminal, a pH entre 6,5 y 6,8, la proporción entre AGV disociados y no disociados es de 100 a 1. La membrana luminal de las células granulosas que tapizan la pared de los prestómagos es permeable a ambas formas de AGV, pero su membrana basal, contra el espacio intersticial, lo es esencialmente sólo a los AGV no disociados. En la célula, los aniones acetato (Ac^-), propionato (Pr^-) y butirato (Bu^-) se asocian con iones H^+ producidos a partir del ácido carbónico, formando ácidos acético (HAc), propiónico (HPr) y butírico (HBu) no disociados. Un poco de HAc se cataboliza hasta CO_2 , la mitad del HPr se transforma en ácido láctico (HLa) y la mayoría del HBu se transforma en betahidroxibutirato (βOHBu) no disociado. Estos productos difunden por gradiente de concentración hacia el líquido intersticial y la sangre, donde el pH elevado los disocia, amortiguándose el H^+ liberado con el tampón bicarbonato, generándose un retorno de CO_2 a la célula, cuyo destino está claramente indicado en la figura. El bicarbonato que retorna al rumen contribuye a amortiguar los H^+ de los AGV disociados, eleva el pH y disminuye el proceso de absorción. El CO_2 generado pasa a la atmósfera ruminal y será eliminado con la eructación (Tomado de Leek, 1999).

El ácido láctico producido por las fermentaciones ruminales se absorbe también no disociado en forma pasiva y según los mismos mecanismos que los AGV. Pero debido a su pK ($= 3,8$) menor al de los AGV, su absorción es muy reducida a pH superiores a 5,5 y sólo aumenta significativamente por debajo de este valor. Además, su absorción sólo es importante cuando su formación es excesiva (por causa de la dieta), pero aún así su tasa de absorción es 1/10 de la de los AGV a igual concentración. El ácido láctico que pasa a la sangre proviene también del proceso de absorción del ácido propiónico, durante el cual la mitad del AP se transforma en ácido láctico. Este proceso se incrementa cuanto mayor sea la producción intrarruminal de ácido propiónico.

En resumen, la tasa de absorción de los ácidos ruminales es mayor cuando sus concentraciones aumentan y el pH desciende.

Una vez absorbido, los principales roles del ácido acético en el metabolismo del rumiante son a) proveedor de energía en todos los tejidos y b) lipogénico y, en el caso de la ubre, es el precursor de la síntesis del 80% de los ác. grasos cortos y medianos que componen las grasas de la leche. El ácido propiónico es casi totalmente captado por el hígado, donde es esencial por su rol neoglucogénico (produce la mayor parte de la glucosa que el rumiante necesita, en particular para sintetizar la lactosa de la leche) y anticetogénico. El ácido butírico es cetogénico: forma el cuerpo cetónico beta-hidroxibutirato (β OHB) durante su absorción por la pared ruminal, el cual aporta energía a los músculos y es precursor de las grasas lácteas, formando el 20% de los ác. grasos cortos y medianos sintetizados en la ubre.

Metabolismo del nitrógeno en el rumen

Digestión del Nitrógeno: degradación de las proteínas de la dieta

La ingestión de alimentos constituye la principal entrada de nitrógeno en el rumen. En el rumiante la alimentación proteica cumple un doble rol: satisfacer las necesidades de nitrógeno de los microorganismos ruminales y aportar aminoácidos al animal. Las necesidades de los microorganismos se pueden cubrir con fuentes de nitrógeno proteico o no proteico, en cambio, las necesidades del animal sólo se pueden cubrir con aminoácidos que pueden ser de origen microbiano o dietético.

El perfil y la calidad de los aminoácidos que llegan al duodeno es diferente al aportado por los alimentos, debido a la degradación ruminal de los aminoácidos dietéticos y al aporte de proteína microbiana sintetizada a partir de la energía derivada de los carbohidratos y de compuestos nitrogenados simples (Wallace & Cotta, 1988). Esta proteína, junto con la que escapa de la degradación ruminal, está fácilmente disponible para su digestión y absorción por el rumiante.

La degradación de las proteínas en el rumen comprende dos etapas. En la primera se produce la ruptura de los enlaces peptídicos y la liberación de los aminoácidos constituyentes de la cadena proteica, algunos de los cuales serán incorporados a la proteína microbiana, y en la segunda la mayor parte de los aminoácidos sufrirán un proceso de decarboxilación y desaminación que dará lugar a la liberación de AGV, CO_2 y NH_3 .

Mecanismo de degradación

Las bacterias son las principales responsables del proceso hidrolítico continuo de las proteínas. La proteína puede ser adsorbida en la superficie de los microorganismos que liberan enzimas proteolíticas, en la vecindad del sitio de adsorción (Brock et al., 1982), degradando las proteínas a péptidos y aminoácidos. La acción sinérgica de diferentes proteasas es necesaria para una degradación proteica completa (Wallace et al., 1997). La tasa y el grado a los cuales ocurre esa degradación dependerán de la actividad proteolítica de la microflora ruminal y del tipo de proteína.

Los péptidos y aminoácidos resultantes de actividad proteolítica extracelular tienen diferentes destinos: pueden abandonar el rumen disueltos

en la fase líquida o ser transportados dentro de la célula microbiana. En ésta los péptidos pueden ser degradados por peptidasas intrabacterianas a aminoácidos y éstos, posteriormente, ser incorporados a la proteína microbiana o degradados por desaminasas intracelulares a ácidos grasos de cadena corta, NH_3 y CO_2 (Tamminga, 1979).

El destino de los péptidos y aminoácidos absorbidos por los microorganismos dependerá de la disponibilidad de energía (CHO). Si la energía es suficiente, los aminoácidos serán transaminados o usados directamente para la síntesis de proteína microbiana. Si la energía es limitada los aminoácidos serán devueltos al medio extracelular. En algunos casos los aminoácidos en exceso serán desaminados intracelularmente, ya que algunas cepas carecen de mecanismos de transporte de aminoácidos desde el citoplasma hacia el ambiente extracelular, su esqueleto carbonado será fermentado hasta AGV y el NH_3 se expulsa al exterior (Tamminga, 1979).

La mayoría de las bacterias ruminales tienen la capacidad de asimilar y emplear el NH_3 como única fuente de N cuando los péptidos o aminoácidos presentes en el líquido ruminal son escasos. La cantidad de NH_3 que permite una digestión máxima en el rumen y a su vez una población alta de microorganismos, variará de acuerdo a la dieta. El nivel crítico se reporta entre 50 a 250 mg de N amoniacal/litro de líquido ruminal, por lo tanto es importante que los niveles de NH_3 en el rumen permanezcan altos (Preston & Leng, 1990).

Parte del NH_3 del fluido ruminal que no es asimilado por los microorganismos es absorbido a través de la pared ruminal hacia la sangre. Reynolds et al. (1994) estimaron que la absorción neta de NH_3 hacia el sistema porta puede representar hasta el 49% del N consumido. Esto es particularmente importante en condiciones de pastoreo cuando se consumen forrajes jóvenes con alto contenido en proteína y de NNP que resulta en altos niveles de NH_3 en rumen (Anissson & Bryden, 1999). El NH_3 llega al hígado transportado por la glutamina portal y bajo forma de ion NH_4 , se incorpora al ciclo de la ornitina transformándose en urea.

Una parte de la urea formada en el hígado es eliminada con la orina pero otra parte retorna al reticulorumen con la saliva y por difusión directa a partir de la sangre que irriga la pared de los preestómagos. La urea que proviene de la sangre es hidrolizada a NH_3 y CO_2 por ureasas sintetizadas por la flora epimural adherida a la pared del rumen. Esta enzima hidroliza la urea a medida que va difundiendo desde la sangre a la luz del órgano gracias a un gradiente de concentración. Este mecanismo de retorno se ve favorecido por uremias elevadas (mayor gradiente de concentración) y por un alto flujo sanguíneo ruminal.

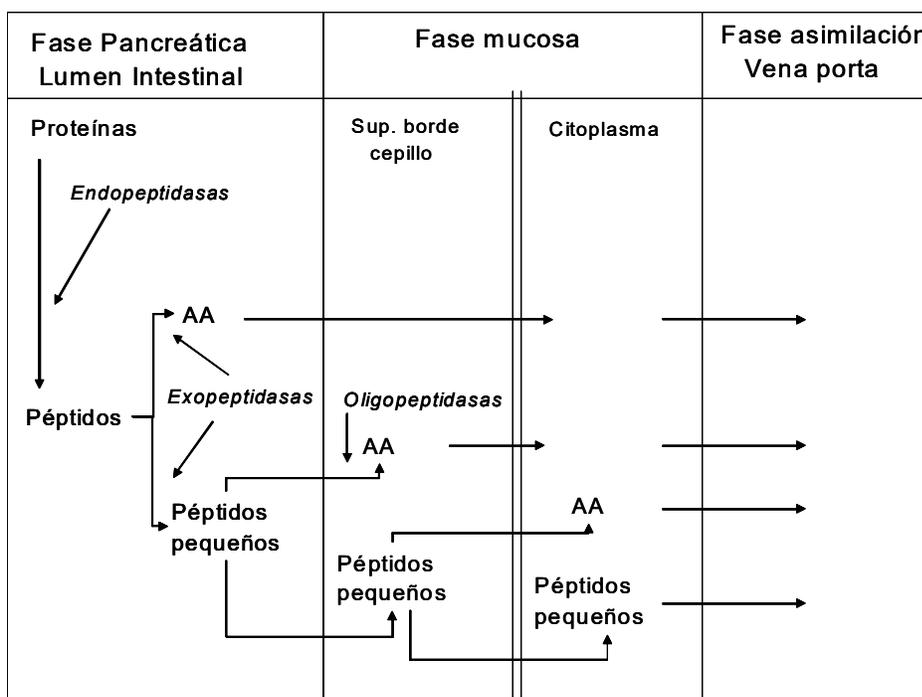
El contenido de la saliva en urea está relacionado directamente con la uremia y la cantidad secretada depende estrechamente del flujo salival (Cirio et al., 2000). Esto significa que el mayor aporte de urea salival al rumen se produce durante la masticación ruminal y de la digestión de los alimentos. La urea que entra a los preestómagos con la saliva es también hidrolizada a NH_3 y CO_2 por ureasas de las bacterias LAB.

Existe entonces en los rumiantes, un verdadero ciclo de la urea que forma parte de los procesos digestivos normales que mueve cantidades importantes de N para su posible reutilización en el rumen para la síntesis

proteica microbiana. Este ciclo amoníaco-urea puede modificarse cuantitativamente en casos de deficiencias en N alimentario o de altos requerimientos proteicos durante los períodos productivos. Por un lado, la cantidad de urea eliminada por los riñones se reduce significativamente gracias a un mecanismo adaptativo que implica una reducción de la perfusión renal con caída de la filtración glomerular y una menor tasa de eliminación de urea durante su paso por el nefrón (Rodríguez et al., 1996; Tebot et al., 1998). Como consecuencia de esa adaptación, se retiene más urea en la sangre, amortiguándose la caída de la uremia por bajo aporte o alto requerimiento. Por otro lado, la proporción de urea transferida al rumen aumenta en relación a su nivel sanguíneo y a la cantidad de N ingerido (Rémond et al., 1993). Esto indica la existencia de un mecanismo capaz de controlar la distribución de los flujos de urea entre las vías renal y digestiva, en función de las necesidades alimentarias: menor eliminación de urea a través de la orina significa un mayor retorno de ésta al rumen.

En el rumen cierta cantidad de proteína de la dieta puede escapar a la degradación ruminal y pasar al intestino sin modificaciones, a ésta se le denomina proteína de paso. La proteína microbiana y la de paso, llegan al abomaso e intestino, donde son digeridas por acción enzimática (pepsina gástrica y tripsina, quimiotripsina, carboxipeptidasa y aminopeptidasa pancreáticas) absorbidas como aminoácidos o pequeños péptidos (Tabla IV). Las peptidasas pancreáticas actúan en el lumen duodenal y yeyunal, pero la absorción de aminoácidos en el rumiante se realiza principalmente en el ileon mediante mecanismos de transporte especializados. Existen por lo menos dos sistemas de transporte activo independientes, uno para aminoácidos neutros y otro para aminoácidos básicos. Además de éstos, se ha establecido que hay sistemas para transportar dipéptidos y tripéptidos hacia la célula y es probable que la mayoría de las proteínas del alimento que escapan del rumen y la proteína microbiana se absorben en esta forma y no en la forma de aminoácidos libres. Los aminoácidos salen del enterocito y pasan a la circulación portal incorporándose al pool de aminoácidos libres circulantes. Los aminoácidos esenciales y no esenciales son aportados por las proteínas microbianas al menos en condiciones de mantenimiento pero esta fuente puede ser insuficiente cuando aumenta el requerimiento proteico por estados de gestación, lactancia o crecimiento.

Tabla IV: Absorción intestinal de aminoácidos (AA) en el rumiante



(Adaptado de De Nervi, 1976)

Factores que afectan la degradación proteica ruminal

Es importante que no solamente las fracciones de proteína que se degradan en rumen estén disponibles en cantidad suficiente para el crecimiento bacteriano. Es necesario además, un sincronismo entre la degradación proteica y la disponibilidad de energía para evitar pérdidas de N y lograr mayor eficiencia en síntesis celular. Este crecimiento está dependiendo estrechamente entonces del aporte de nutrientes y de la velocidad a la cual los microorganismos del rumen lo utilizan.

La proteína no es completamente degradada o fermentada en el rumen. La cantidad de proteína sin alterar que alcanza el duodeno, depende de la proporción de proteína susceptible de ser degradada, del ritmo de dicho proceso de degradación y del tiempo de su permanencia en el rumen (Ørskov & Mc Donald, 1979). Otros factores que también afectan la degradación proteica microbiana incluyen el tipo de proteína, la interacción con otros nutrientes (principalmente CHO) y la población microbiana predominante (dependiendo del tipo de ración, tasa de pasaje y pH ruminales).

La solubilidad de las proteínas es un factor clave en la determinación de su sensibilidad hacia las proteasas microbianas y por lo tanto de su degradabilidad. En general se considera que las proteínas solubles son más vulnerables que las insolubles a la flora microbiana debido a que son más accesibles a los microorganismos. Por ejemplo, entre las proteínas de los granos, las prolaminas y glutelinas son insolubles y de degradación lenta,

mientras que las globulinas son solubles y altamente degradables en el rumen (Romagnolo et al., 1994).

La estructura de la proteína también es importante. Algunas albúminas son solubles pero contienen puentes disulfuro que las hacen de degradación lenta en el rumen demostrando así que hay otros factores aparte su solubilidad que afectan su degradabilidad.

Las peptidasas y las desaminasas pueden sufrir un proceso de *inhibición por los productos terminales*. Velle et al. (1997) perfundieron cantidades crecientes de diferentes aminoácidos (75, 150, 300 y 600 mmol) en el rumen y encontraron que la degradación de aminoácidos disminuía a medida que la cantidad perfundida aumentaba.

El pH óptimo para las enzimas proteolíticas se sitúa entre 5.5 y 7.0 de acuerdo con Kopecny & Wallace (1982), sin embargo la degradación proteica se encuentra reducida en el valor más bajo de este rango. Cardozo et al., (2000, 2002) trabajando con fermentación *in vitro* donde se comparaban raciones con alto contenido en forraje vs alto contenido en concentrados a pH situados entre 4.9 y 7.0 demostraron que la degradación proteica estaba reducida en ambas raciones a medida que el pH descendía. A pesar que las bacterias amilolíticas tienden a ser más proteolíticas que celulolíticas (Wallace et al., 1997) la degradación proteica en los estudios de Cardozo et al. (2000, 2002) fue siempre baja cuando se proveía a los microorganismos raciones con alto contenido en concentrados, independientemente del pH. Una disminución en el pH ruminal de 6.5 a 5.7 reduce la concentración de NH₃ cuando las bacterias para la fermentación *in vitro* son obtenidas de animales alimentados con una ración de 100% de forraje, sin embargo cuando se utilizan bacterias de animales alimentados con raciones conteniendo 90% de concentrado tienen menor producción de NH₃ independientemente del pH (Lana et al., 1998). Estos resultados muestran que la reducción en la degradación proteica no es solamente debido al efecto del pH, sino que también está relacionado al tipo de sustrato a ser fermentado o al la población microbiana predominante inducida por el uso de una ración en particular.

Síntesis de proteína microbiana en el rumen y su eficiencia

Síntesis de proteína microbiana

La síntesis de proteína microbiana se puede definir como la cantidad de proteína de origen microbiano producida en el rumen (síntesis neta), y se expresa en gramos de N o de proteína (N x 6.25) por día (Van Soest, 1994; Broudiscou & Jouany, 1995). Sin embargo, en la práctica suele medirse como la cantidad de proteína microbiana sintetizada en el rumen que fluye al duodeno (flujo de proteína microbiana). La síntesis diaria de proteína microbiana no es equivalente al flujo diario, ya que una parte importante de la proteína microbiana sintetizada en rumen no llega al intestino delgado, sino que se recicla dentro del rumen en proporciones variables, como consecuencia de la actividad predatoria de los protozoos, y en menor grado, a la acción de los bacteriófagos y micoplasmas (Firkins, 1996). El reciclaje de N afecta a la cantidad y a la eficiencia neta de la conversión de los sustratos en proteína microbiana, dado que la proteína microbiana

degradada está sujeta a la desaminación requiriéndose energía para sus resíntesis (Dijkstra et al., 1998).

Factores que afectan la síntesis de proteína microbiana y su eficiencia

El rumen es un ambiente complejo poblado de diferentes especies microbianas, cada una de las cuales tiene distinto metabolismo y requerimientos nutritivos. Por lo tanto considerar los requerimientos nutritivos de los microorganismos ruminales es crucial para entender el metabolismo del N en el rumen así como los factores que puedan modificarlo.

Factores relacionados con el aporte de nutrientes en la dieta

Los aportes de energía y de proteína necesarios para el crecimiento de los microorganismos constituyen los principales factores limitantes de la síntesis de proteína microbiana en el rumen (Hoover & Stokes, 1991, Clark et al., 1992). El crecimiento de las células microbianas depende principalmente de la degradación de la materia orgánica aportada al rumen, que proporciona la energía y los monómeros necesarios para la síntesis de los constituyentes celulares (proteínas, polisacáridos, lípidos, ácidos nucleicos). La energía se obtiene fundamentalmente de la degradación de los CHO y el N puede provenir del NNP, de la proteína verdadera y/o del aporte endógeno. Otros nutrientes, como el azufre, los ácidos grasos volátiles de cadena ramificada (AGV-R) y los minerales y vitaminas, también son esenciales, aunque en una proporción menor. Numerosos factores relacionados a la dieta pueden alterar la disponibilidad de energía y de N para el crecimiento bacteriano.

Aportes de energía

Los CHO (estructurales y no estructurales) constituyen la fuente principal de energía para la síntesis de proteína microbiana en el rumen, representando entre un 65-75% de la MS de la dieta de un rumiante (Sniffen & Robinson, 1987). Los productos finales de la fermentación de los CHO (ATP y esqueletos carbonados) son utilizados por los microorganismos para la síntesis de proteína microbiana (Hvelplund & Madsen, 1985; Russell & Wallace, 1988; France & Siddons, 1993). Aunque los microorganismos ruminales pueden obtener energía a partir de otras fuentes como las proteínas y las grasas (Hvelplund & Madsen, 1985), la contribución de estos compuestos al aporte global de energía utilizada para la síntesis de proteína microbiana es reducida. Por un lado, representan una menor proporción en las dietas comúnmente utilizadas en rumiantes y, por el otro, su aporte energético es escaso cuando estos sustratos son fermentados anaeróbicamente. Así la proteína aporta la mitad de la energía que los CHO (Demeyer & Van Nevel, 1986; Tamminga, 1979) y de cada mol de triglicéridos aportado, sólo el glicerol puede ser fermentado en el rumen (Hvelplund & Madsen, 1985).

Sin embargo, el crecimiento bacteriano se acelera cuando se adiciona aminoácidos y/o péptidos a cultivos de bacterias amilolíticas y celulolíticas (Kernick, 1991; Maeng & Baldwin, 1976;). Igualmente, la digestión de la fibra

se incrementa con el suministro de aminoácidos (Carro & Miller, 1999) y péptidos (Cruz Soto et al., 1994) a cultivos puros de bacterias celulolíticas. Más recientemente, Atasoglu et al. (2001) demostraron que la incorporación de N-NH₃ al N microbiano disminuía proporcionalmente al aumento de aminoácidos adicionados en el medio de cultivo. Esto sugiere que las bacterias celulolíticas también podrían utilizar aminoácidos si ellos están disponibles en el medio. Algo similar sucede cuando se aumenta la proporción de péptidos en el cultivo celular, a pesar que Atasoglu et al. (2001) demostraron una mayor preferencia a la incorporación de aminoácidos que de péptidos.

El aumento en el crecimiento bacteriano observado por la adición de aminoácidos y/o péptidos podría deberse a la incorporación directa de éstos a la proteína microbiana o al aumentar la disponibilidad de los esqueletos carbonados (provenientes de la desaminación de los aminoácidos), los cuales sería utilizados como fuente de energía de producción o como esqueletos carbonados para la formación de nuevos aminoácidos microbianos (Bryant, 1973).

El 66% de la proteína microbiana formada por los microorganismos que fermentan el almidón derivan de aminoácidos y péptidos, y el resto proviene del N-NH₃ (Russell et al., 1983). Estos autores afirman que esta proporción no es influenciada por la tasa de crecimiento microbiano y que ante la ausencia de CHO, todo el N proveniente de péptidos puede ser convertido en NH₃.

Recientemente, Atasoglu et al. (2004) estudiaron el destino del N y los carbonos de los aminoácidos en cultivos mixtos de microorganismos ruminales. Los resultados muestran que algunos aminoácidos fueron sintetizados con más dificultad que otros, lo que sugiere que ciertos aminoácidos pueden ser limitantes para el crecimiento bacteriano. Estos autores confirman la teoría de la dificultad de las bacterias para sintetizar algunos aminoácidos (fenilalanina, leucina) propuesta por Amin & Onodera (1997) y proponen a la leucina como un aminoácido potencialmente limitador del crecimiento. Por lo tanto, el asegurar un suministro importante de aminoácidos específicos podría resultar en un mayor crecimiento microbiano.

La disponibilidad de energía está reconocida como el principal determinante del crecimiento microbiano por los distintos modelos que se utilizan para predecir la síntesis de proteína microbiana (Dijkstra et al., 1998). El sistema de predicción desarrollado por la Universidad de Cornell, Cornell Net Carbohydrate and Protein System (CNCPS), divide el ecosistema microbiano ruminal en dos grupos en función del tipo de CHO que fermentan (Russell et al., 1992). Esta clasificación se basa en el uso preferencial de la energía y a que ambas poblaciones difieren en necesidades de mantenimiento y tasa de crecimiento. Los microorganismos que degradan los CHO estructurales (celulolíticos) tienen bajos requerimientos de mantenimiento, crecen lentamente y utilizan el N-NH₃ como su principal fuente de N, mientras que los microorganismos que degradan los CHO estructurales (amilolíticos) tienen altos requerimientos de mantenimiento, crecen rápido y utilizan el NH₃, los péptidos y los aminoácidos como fuentes de N. (Russell et al., 1992). Esta diferenciación entre cantidad de energía utilizada por los microorganismos para las

funciones de mantenimiento y crecimiento indica que la cantidad de proteína sintetizada o la eficiencia energética de síntesis variará con el tipo de sustrato fermentado y su ritmo de degradación (Nozière & Michalet-Doreau, 1997).

Existen diferencias en cuanto al grado y velocidad de degradación de los carbohidratos entre y dentro de las distintas fuentes de CHO aportados en la dieta (Van Soest, 1994, NRC, 2001). El CNCPS toma en cuenta estas diferencias al momento de estimar la cantidad de energía aportada por los CHO de la dieta (Sniffen et al., 1992). Los CHO se clasifican en cuatro fracciones diferentes dependiendo de su velocidad de degradación:

Fracción A = rápida: carbohidratos no estructurales (azúcares)

Fracción B1 = intermedia: almidones y pectinas cuya degradabilidad ruminal es del 90 – 100%

Fracción B2 = lenta: componentes disponibles de la pared celular cuya degradabilidad oscila entre el 50 – 75%,

Fracción C = fibra indigestible: lignocelulosa o lignocarbohidratos

Estas fracciones se estiman a partir del contenido de CHO estructurales, CHO no estructurales y fibra indigestible mediante el análisis secuencial de FND.

Existen diferencias en el ritmo de degradación ruminal dependiendo del tipo de dieta y su composición. Así la velocidad de degradación es diferente entre gramíneas y leguminosas (Van Soest, 1994), el almidón y las pectinas (Bach et al., 1999) y entre los cereales dependiendo del tipo, estructura y procesado al que hayan sido sometidos (Herrera-Saldana et al., 1990, McAllister et al., 1993).

El utilizar CHO con diferentes velocidades de degradación puede afectar la síntesis de proteína bacteriana y la eficiencia de síntesis microbiana (ESM), ya que modifican el perfil de liberación de energía para el crecimiento microbiano. Los CHO rápidamente fermentescibles, como el almidón o los azúcares, son más efectivos que otras fuentes de CHO, como la celulosa, para promover el crecimiento microbiano (Stern & Hoover, 1979). Varios estudios *in vitro* (Stern et al., 1994; Henning et al., 1991) e *in vivo* (Cameron et al., 1999) demostraron que infusiones crecientes de CHO rápidamente fermentescibles disminuían las concentraciones de N-NH₃ al mejorar la captación de N por los microorganismos.

Otros estudios *in vitro* (Demeyer & Van Nevel, 1986) indican que los CHO no estructurales favorecen la síntesis y la eficiencia de síntesis de proteína microbiana. Cuando la disponibilidad de energía es elevada (como sucede con dietas ricas en almidones), la velocidad de crecimiento de las bacterias amilolíticas es elevada. A medida que la velocidad de crecimiento aumenta, la proporción de energía destinada a mantenimiento disminuye, lo que explicaría la mejora en la eficiencia de crecimiento (Russell et al., 1992)

Los experimentos *in vivo* indican que la eficiencia de síntesis es mayor en dietas a base de forrajes comparado con dietas a base de concentrados (Archimède et al., 1997). La inclusión de altos niveles de CHO no estructurales en la dieta, provoca cambios en el patrón de fermentación. Este tipo de CHO favorece un incremento en la proporción de propionato a expensas del acetato, y la acumulación potencial de lactato, provocando una

disminución en el pH ruminal y afectando a la degradabilidad de la MO y al crecimiento microbiano (Russell & Wilson, 1996). Tales efectos ayudan a explicar la menor ESM y la menor síntesis de proteína microbiana observada *in vivo* cuando se suministran dietas ricas en azúcares y almidones (Russell & Wallace, 1988; Demeyer, 1991). Sin embargo, la administración de cantidades moderadas de CHO no estructurales en dietas a base de forrajes favorece tanto la síntesis de proteína microbiana (g N microbiano/d) como la eficiencia de síntesis (Archimède et al., 1997), debido fundamentalmente al incremento en la disponibilidad de sustrato y en el ritmo de crecimiento de las bacterias asociadas con la fracción líquida del contenido ruminal (Dewhurst et al., 2000). En la revisión realizada por Archimède et al., 1997, se concluyó que el flujo de N microbiano al duodeno se incrementa con la inclusión de CHO no estructurales alcanzando un valor óptimo cuando el nivel de inclusión es cercano al 50%, a partir del cual el flujo microbiano comienza a disminuir.

Aportes de nitrógeno

El N es el otro factor relacionado con la dieta que más limita el crecimiento y la síntesis de proteína microbiana en el rumen (Stern & Hoover, 1979; NRC, 2001). Como ya se ha indicado, los microorganismos ruminales pueden hacer uso de distintas fuentes de N degradable (NH_3 , aminoácidos y péptidos), provenientes de la degradación de la proteína aportada por la dieta, así como del NH_3 derivado de las fuentes de NNP o la urea reciclada a través de la pared del rumen y de la saliva. Cuando el aporte de N (tipo y cantidad) es inadecuado, disminuye el crecimiento bacteriano y se reduce la actividad fermentativa (Stern et al., 1994), sin embargo la eficiencia de síntesis se mantiene (Tebot et al., 2002).

En líneas generales varios autores indican que la síntesis de proteína microbiana (g/d) y la ESM se incrementan en respuesta al aumento del contenido de proteína degradable en la dieta (Clark et al., 1992; Erasmus et al., 1994). Sin embargo Calsamiglia et al. (1995) no observaron diferencias en la síntesis (g N microbiano/d) ni en la ESM utilizando 8 fuentes de proteína diferentes cuya degradabilidad ruminal osciló entre el 11 y 100%. Estos autores señalan que los aportes de proteína degradable se mantuvieron por encima del 9% de la MS ingerida y por lo tanto no limitó el crecimiento bacteriano.

Sincronización en los aportes de energía y proteína

Tan trascendente como el suministro de niveles adecuados de nutrientes para los microorganismos, es la sincronía con que éstos son proporcionados. Cuando la tasa de degradación proteica excede la tasa de CHO fermentados, grandes cantidades de N pueden ser perdidas como NH_3 , e inversamente, cuando la tasa de fermentación de los CHO excede la tasa de degradación proteica, la síntesis proteica microbiana puede disminuir (Nocek & Russell, 1988). Los efectos de la sincronización CHO/N, estudiados por muchos autores, no son concluyentes y a veces contradictorios. Mientras que algunos estudios *in vivo* muestran una respuesta positiva en la producción de proteína microbiana (Herrera-Saldana

et al., 1990; Matras et al., 1991), estudios *in vitro* no encuentran ninguna mejora en la producción (Henning et al., 1991; Newbold & Rust, 1992).

A pesar que el concepto de sincronización proteínica y energía tiene una base teórica sólida es probable que, en el complejo ecosistema microbiano ruminal cuando el aporte de nutrientes es sincronizado para una subpoblación específica no lo sea para otra.

Eficiencia de síntesis microbiana

Maximizar el crecimiento bacteriano y la cantidad de proteína degradable en rumen son dos parámetros a tener en cuenta al momento de establecer las estrategias de nutrición en rumiantes. Al maximizar la captura del N degradable mejoramos el suministro de aminoácidos al intestino y disminuimos las pérdidas de N. La eficiencia de crecimiento microbiano se establece como los gramos de N microbiano/unidad de energía disponible en rumen, generalmente expresado como MO o CHO fermentados. Esta forma de expresar la eficiencia es utilizable cuando se supone que la energía es el factor limitante para el crecimiento bacteriano. De esta forma, el maximizar la cantidad de proteína microbiana por unidad de materia fermentable debería resultar en un máximo de crecimiento bacteriano.

La ESM es un indicador útil cuando se necesita saber cuanta energía es dirigida hacia la incorporación de N por los microbios, sin embargo la ESM es incapaz de predecir cuanto N disponible está realmente siendo utilizado por los microbios (Bach et al., 2005). El NRC (2001) describe una relación negativa entre el balance ruminal de N y la ESM, sugiriendo que con abundancia de N, la ESM es más baja que cuando la disponibilidad de N es el factor limitante del crecimiento.

Una medida alternativa y complementaria de la ESM es el uso de la eficiencia de utilización del N (EUN). En contraste con la ESM es una buena herramienta para describir la eficacia de captura del N por los microbios ruminales. Varios autores presentaron formulas alternativas para la EUN en el rumen. Griswold et al.(2003) utilizaron la proporción de N ingerido convertido en N microbiano, y Bach et al. (1999) propusieron para expresar la EUN los gramos de N microbiano/gramos de N disponible x 100.

El N disponible representa el N que potencialmente podría ser utilizado por las bacterias ruminales, comprendiendo la proteína degradable en rumen más la proteína endógena. En trabajos realizados *in vitro* (Bach et al., 2005) se demostró que cuando la EUN aumentaba, la acumulación de N en los fermentadores disminuía, indicando la habilidad de la EUN para efectivamente describir la eficiencia de captura del N por los microbios ruminales.

Tanto la ESM como la EUN son herramientas complementarios para medir la eficiencia microbiana de utilización de los nutrientes; la ESM es un indicador confiable de la utilización de la energía mientras que la EUN es un indicador confiable de la utilización del N.

La suplementación energética

La suplementación de regímenes basados en pasturas con concentrados ricos en energía es tradicionalmente utilizada para incrementar la ingestión *per se* cuando la disponibilidad del forraje es baja, para mantener el peso vivo durante escasez de alimentos de poca duración o para enfrentar situaciones de alta producción (lactación, feed lots).

Los suplementos ricos en energía (SRE) también son utilizados para optimizar la función ruminal con el objeto, por lo general, de aumentar el suministro de energía y de aminoácidos microbianos para el animal y así mejorar la retención de N. Los SRE proveen una fuente extra de materia orgánica fermentescible (MOF) para la biomasa microbiana ruminal. Cuando se sincroniza con un suministro de nitrógeno amoniacal ($N-NH_3$) y otros nutrientes microbianos, esta forma de suplementación puede llevar a una mayor producción de células microbianas e indirectamente aumentar el flujo de proteína microbiana hacia el intestino delgado (Obara et al, 1991). Los aminoácidos extra y la energía digestible pueden mejorar el aporte nutricional hacia el animal aumentando la eficiencia del uso de nutrientes para la producción.

Tipo y forma del suplemento

Los SRE se pueden dividir en dos clases principales: los azúcares y los extractos derivados de ellos (glucosa, melaza) por un lado y los granos de cereales (maíz, cebada, avena, trigo principalmente) por otro. Los azúcares y sus extractos son rápidamente degradados en el rumen con una baja tasa de paso. Los azúcares difieren en sus tasas de fermentación y en el grado en el cual afectan la concentración de NH_3 y el pH, cambios en los niveles de AGV y el aumento de la producción de ácido láctico (Chamberlain et al, 1993). Los granos de cereales, por su alto valor energético y alta palatabilidad, son materias primas de elección para cubrir las necesidades energéticas de los rumiantes en producción. Contienen altos y variables proporciones de almidón (60 a 80 %) y son relativamente pobres en azúcares solubles (4-6%) y proteína cruda (6-14%). La tasa de digestión del almidón de los cereales es más baja que la de los azúcares, varía de forma considerable de unos granos de cereales a otro y depende de factores como el tipo de grano y de procesamiento.

Aunque la digestión del almidón de los granos es prácticamente completa en el rumiante, existen diferencias según el tipo de cereal, en cuanto a la proporción de almidón soluble (hidrolizado rápidamente), la fermentada en el rumen y la digerida en el intestino. El almidón de trigo y la cebada se caracterizan por una fermentación más rápida y completa en el rumen que el de los granos de maíz o sorgo (Sauvant et al , 1994). Como consecuencia, los primeros proporcionan más energía disponible para los microorganismos del rumen, favoreciendo la síntesis de proteína microbiana, pero también son más susceptibles de ocasionar problemas de acidosis en raciones concentradas (Cullen et al, 1986). Aunque la estructura del gránulo

de almidón y la proporción amilasa/amilopectina difieren entre el maíz y la cebada, la digestión de los almidones puros de ambos granos es muy similar (Mc Allister et al, 1993). El factor de mayor importancia que parece explicar las diferencias de digestión entre los diferentes granos de cereales es la matriz proteica que envuelve los gránulos de almidón. La velocidad de degradación ruminal de la proteína de la matriz determina la velocidad de hidrólisis del almidón, ya que la superficie de almidón en contacto con las amilasas aumenta a medida que aquella se degrada. A mayor proporción de proteínas de reserva, (prolamina y glutelinas), que se caracterizan por una menor solubilidad y una velocidad de hidrólisis más lenta, y una menor proporción de proteínas solubles (albúminas y globulinas) la degradabilidad media de la proteína de matriz va a variar siendo mayor para el trigo y la cebada (70 – 80%) que para el maíz y el sorgo (40 – 45%) (Smet et al., 1995).

Por otra parte, las células del endospermo harinoso (que representan un 50% del total en los granos de maíz y sorgo, y hasta un 80% en el trigo) se caracterizan por poseer gránulos de almidón grandes rodeados por una matriz proteica discontinua, mientras que en el endospermo córneo los gránulos de almidón son pequeños y la matriz es aproximadamente continua. Las bacterias tienden a colonizar inicialmente las regiones situadas entre gránulos de almidón aprovechando los puntos de ruptura de la matriz proteica. Consecuentemente el ataque microbiano se ve favorecido cuanto mayor es la proporción de endospermo harinoso en el grano de cereal.

Desde la antigüedad es sabido que los granos de cereales requieren de algún tipo de procesamiento para su adecuada utilización y aprovechamiento como recursos alimenticios, ya que de lo contrario, una gran cantidad del grano consumido aparecerá intacto en las heces (masticación incompleta). Su procesamiento permitiría la ruptura de su estructura original y la liberación del contenido del grano, mayoritariamente almidón y de una pequeña porción proteica, exponiéndolos a la acción de las enzimas digestivas y asegurando su adecuada digestibilidad.

Sin embargo, en los bovinos, los trabajos realizados por Theurer (1986) reportan que dependiendo del tipo de cereal, hasta el 30% o más de los granos consumidos enteros, pueden aparecer en las heces sin aparentemente haber sufrido ningún proceso digestivo evidente. Al no haber sido masticados, su estructura permanece intacta y resistente tanto a la acción de las enzimas microbianas, como también a las secretadas por el tracto gastrointestinal del animal, impidiendo su utilización digestiva.

En los rumiantes menores, ovinos y caprinos, los granos de cereales suministrados enteros son bien digeridos, debido a que el tamaño del orificio reticulo-omasal, es lo suficientemente pequeño para no dejar pasar el grano de cereal entero hacia el retículo. Debido a ésto el grano es devuelto a la boca durante la rumia para ser remasticado y destruida su estructura.

Con el objeto de incrementar la utilización digestiva de los granos de los cereales en rumiantes, se han desarrollado distintas tecnologías.

La molienda de los granos de cereales, al romper las células del endospermo, facilita la colonización y digestión microbiana y, por tanto, la degradación del almidón en el rumen (Mc Allister et al, 1993). Sin embargo, los gránulos de almidón permanecen embebidos en la matriz proteica, por lo

que la digestión efectiva del almidón de los granos finamente molidos es inferior a su degradabilidad potencial.

Nivel de suplementación y consumo

Proveer energía adicional bajo forma de suplemento frecuentemente produce reducción de la ingesta de forraje. Los datos encontrados en la bibliografía son contradictorios en este aspecto. Henning et al (1980) reportan en ovinos que bajos niveles de suplementación con maíz (7,8% de la ingesta de MS) incrementa el consumo de forraje, en tanto que, niveles mayores al 23%, lo redujeron. Matejovsky & Sanson (1995) también informan que bajos niveles de suplementación energética en ovinos consumiendo dietas basadas en forraje han aumentado el consumo. Este hecho se ve más frecuentemente en estudios llevados a cabo en ovinos que en bovinos (Caton & Dhuyvetter, 1997). Como regla general, cuando el nivel de energía del suplemento aumenta, el consumo disminuye. La tasa de ingesta del suplemento relacionada a la ingesta de la dieta basal es crítica para alcanzar los efectos de sinergismo. Si el suplemento constituye más del 25% de la ingesta total, el consumo de la dieta basal puede verse reducida, dándose el llamado efecto de sustitución.

Altos consumos de energía digestible suplementaria a menudo tienen un efecto negativo en la producción animal. Esto es debido a la disminución del pH ruminal por debajo del pH óptimo para la acción de las bacterias celulolíticas, con el resultado de una reducida digestión de la fibra.

Efectos de los SRE sobre la función ruminal

La fermentación de los SRE en el rumen aumentan la oferta de ATP a los microorganismos, promoviendo su multiplicación y de esa forma incrementar la producción de AGV. Sin embargo, las modificaciones de la fermentación pueden afectar otras actividades en el rumen.

Efecto sobre el pH y digestibilidad de la fibra. El pH ruminal ha recibido una especial atención como el mecanismo que explicaría las reducciones en la ingesta y la digestibilidad del forraje resultante de la suplementación energética. La acidificación del pH es el gran riesgo de la adición de SRE a las dietas. La estructura no fibrosa de estos carbohidratos estimulan escasamente las masticaciones de ingestión y de rumia, siendo la producción de saliva menor que en el caso de la fibra vegetal, por lo que el líquido ruminal estará menos tamponado. Por otra, son muy fermentescibles y producen gran cantidad de AGV, en especial el ácido propiónico (Orskov, 1992). Las bacterias amilolíticas son resistentes al pH ácido, pero pueden desestabilizar el resto de la fermentación ruminal, inhibiendo la actividad de las bacterias celulolíticas. Este proceso se esquematiza en la Figura 3.

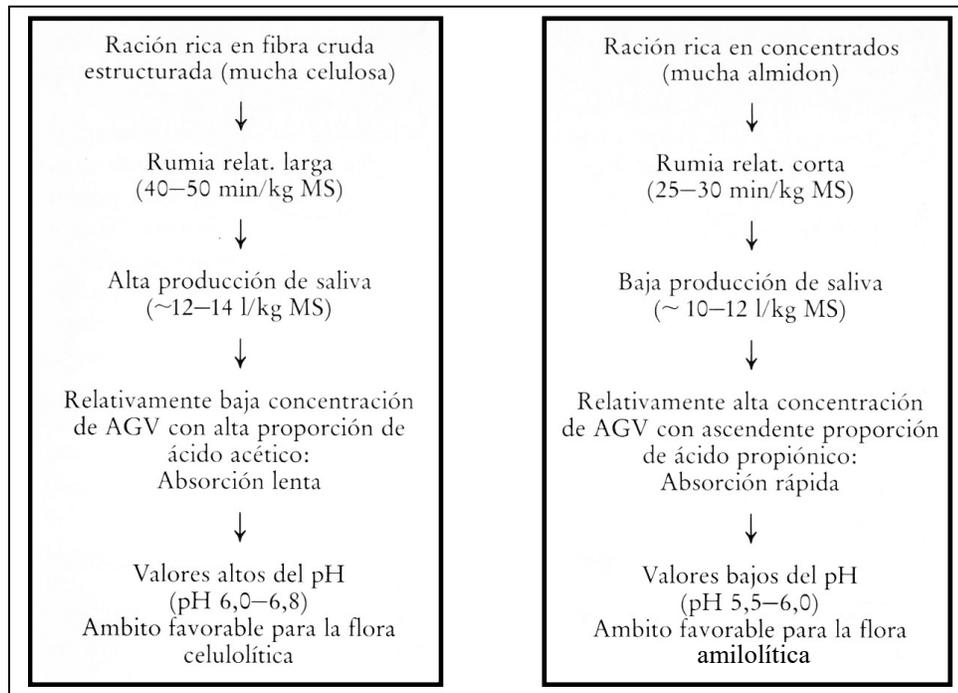


Figura 3: Secuencia de eventos que lleva la adecuación del pH para optimizar la digestión de cada uno de los dos principales tipos de CHO de la alimentación del rumiante (Kauffman, 1972)

Efecto sobre la digestión de la materia orgánica (MO). La rápida fermentación de los SRE incrementa la producción de microorganismos y de AGV, pero también puede cambiar la proporción relativa de AGV, aumentando la concentración de propionato y/o butirato con respecto al acetato. El nivel de este incremento depende del sustrato, de la naturaleza de la población microbiana y de la eficiencia de utilización del ATP para la producción de microorganismos.

Teóricamente, los cambios en las proporciones relativas de AGV tendrán sólo un pequeño efecto en la generación de ATP y por lo tanto en la producción de microorganismos. Pero si la producción de propionato está aumentada y más propionato es absorbido por el animal, esto será utilizado en la producción de glucosa (neoglucogenesis). Utilizando como suplemento cereales enteros o partidos, parte del almidón puede escapar de la degradación ruminal y ser enzimáticamente digerido en el intestino delgado (Huntington, 1997). Leng (1982) propone que cualquier manipulación que aumente la absorción de propionato o incremente el escape de carbohidratos de la dieta hacia el intestino tiene el potencial de aumentar la producción animal a pesar del contenido proteico de la dieta.

Efecto sobre NH₃ ruminal y síntesis de proteína microbiana. El NH₃ es una fuente esencial de N para muchas especies de microorganismos ruminales. El contenido ruminal de proviene de varias fuentes: la dieta, el nitrógeno no amoniacal y la urea salivales, la transferencia de urea transmural, células de descamación del epitelio así como de la lisis de microorganismos ruminales. La contribución del N no amoniacal dietético hacia el N amoniacal ruminal dependerá del contenido nitrogenado de la dieta y de la solubilidad y degradabilidad de la proteína dietética. En las dietas basadas en pasturas frescas esta contribución llegaría al 80%. Además, el NH₃ presente en las pasturas frescas (5% aproximadamente del N total) contribuye directamente al pool de NH₃ ruminal.

En rumiantes alimentados con dietas basadas en pasto, las estimaciones de niveles mínimos de N amoniacal necesarios para un eficiente crecimiento celular y producción de proteína varían, sugiriendo que las concentraciones de N amoniacal por sí solas son un pobre indicador de la suficiencia de N para un eficiente crecimiento microbiano.

En animales alimentados con silo, henos o alfalfa fresca la adición de suplementos derivados del azúcar o almidón a la dieta basal casi siempre determina una disminución de los niveles de NH₃ ruminal. Estos bajos niveles de NH₃ en animales suplementados con energía están asociados con el aumento de la tasa de fermentación que es proporcionada por la energía adicional, estimulando una mayor captación de N amoniacal para la síntesis de proteína microbiana. Esto indicaría que la tasa de crecimiento microbiano está limitada inicialmente por una escasez de ATP más que por los bajos niveles de NH₃.

Efecto sobre el metabolismo de la urea. La cantidad de urea reciclada hacia el rumen, tanto por la saliva como a través de la pared ruminal, está directamente relacionada a la cantidad de urea sintetizada en el hígado, la cual, a su vez es proporcional a la cantidad del N ingerido, a la degradabilidad del N dietético y a la absorción de NH₃

Cuando los animales son suplementados con SRE hay usualmente un marcado aumento de la cantidad o proporción de urea reciclada hacia el rumen (Obara & Shimbayashi, 1980). Este aumento en la transferencia de urea en los animales suplementados sería debido a un incremento en la permeabilidad de la pared ruminal y es independiente de la uremia y el reciclado vía saliva.

Ensayo Experimental

ANTECEDENTES

Para poder definir las estrategias de suplementación en animales en regímenes de pastoreo y verdes debemos analizar las características de la dieta base que condicionará las respuestas productivas, así como la pertinencia y los potenciales beneficios de una suplementación energética.

Valor nutricional del forraje como dieta base

Los pasturas de alta calidad proveen una importante cantidad de nutrientes para satisfacer los requerimientos de los animales en pastoreo (Leaver, 1985), aunque la producción animal obtenida es ampliamente variable entre épocas y entre especies forrajeras o pasturas (Elizalde & Santini, 1992). Una limitación importante derivada de la utilización del forraje es que el forraje producido por una pastura no es el mismo a través de los años y no es lo mismo el potencial de producción de una pastura nueva comparada con una pradera degradada. Esto determinará variabilidad en la respuesta animal al no satisfacerse las necesidades nutricionales (baja calidad) o ante una baja oferta forrajera (Obispo et al., 2001).

Además de la especie forrajera y de la parte de la planta utilizada, la composición del forraje está afectada por la etapa fisiológica del vegetal al momento del pastoreo o del corte y la hora del día (Elizalde et al., 1999a). En los estados vegetativos tardíos, los forrajes aumentan su contenido en lignina, lo cual provoca un marcado descenso en la degradabilidad de los elementos contenidos en la pared celular, reduciendo la disponibilidad energética para el rumiante (Minson, 1981). Existen también variaciones importantes en proteína y CHO solubles a través del día y estos cambios pueden ser diferentes entre períodos del año (Van Vuuren et al., 1986). En Uruguay, Repetto et al., (2003 a,b) verificaron significativos aumentos en los contenidos de CHO en gramíneas y leguminosas en el transcurso del día durante el otoño. Asimismo, Cajarville et al. (2006), trabajando en pasturas templadas en nuestro país, señalan un menor pH ruminal en animales que consumieron forraje por la tarde en comparación con el mismo forraje cortado en la mañana, debido al incremento de CHO en los forrajes cortados durante la tarde en relación a los segados durante la mañana.

Una vez consumido, el forraje fresco es sometido a una intensa digestión ruminal en donde el 90 % de la materia orgánica digestible es fermentada en el rumen (Corbett & Pickering, 1983; Elizalde et al., 1999b,c). Gran parte de la digestión ruminal concierne la digestión de la fibra: al inicio de la digestión los CHO solubles aportan rápidamente energía para la flora celulolítica, que sólo será capaz de obtenerla de la celulosa para su metabolismo hasta que las macromoléculas de las paredes vegetales sean digeridas (Elias, 1983).

La proteína de los forrajes frescos es altamente degradable en rumen con un promedio del 75-85 % para las diferentes especies (Elizalde et al., 1999a,c). Debe existir una relación entre la digestión de la materia orgánica como proveedora de energía y el contenido proteico del forraje para evitar desbalances de nutrientes. En forrajes frescos y en determinadas épocas del año, ocurren considerables pérdidas de nitrógeno en el rumen debido a que su contenido excede la disponibilidad de energía en rumen limitándose la capacidad de síntesis microbiana. La rápida fermentación del N proveniente

del pasto fresco y el alto contenido de N de la dieta provocan una rápida producción de NH_3 (en gran proporción en su forma no ionizada) debido a los altos pH asociados a estas dietas (Siddons et al, 1986). Cuando el contenido de N del forraje es mayor a 25-30 g N/kg MS una gran cantidad de proteína cruda degradada en el rumen es absorbida como N-NH_3 y luego eliminada en la orina bajo forma de urea (Beever et al, 1986). Este N ureico urinario representa una pérdida en la potencialidad de síntesis de aminoácidos a nivel ruminal (Wallace, 1994), además de polución nitrogenada del ambiente, fenómenos ambos altamente deseables y posibles de evitar con una apropiada suplementación energética.

Conveniencia de la suplementación

El uso de una fuente de energía fermentescible adicional ha sido propuesto como forma de incrementar la captura microbiana de NH_3 y mejorar la retención de N y por ende la producción de proteína microbiana (Elizalde et al., 1999b; Jetana et al., 2000). La suplementación energética es frecuentemente practicada durante los meses de invierno cuando la disponibilidad de forraje es escasa para compensar la falta de nutrientes o para alcanzar las demandas de producción (Caton & Dhuyvetter, 1996).

En general, cuando se realiza una suplementación energética de pasturas existen tres aspectos importantes que deben ser analizados. Uno de ellos está relacionado con el efecto del suplemento sobre la digestión del forraje, básicamente de los componentes de la fibra, otro es el de la sustitución del forraje por el suplemento (Elizalde, 2003) y un tercero es la fuente y la forma del suplemento.

Grant & Mertens (1992) demostraron que la suplementación excesiva o con tipos de carbohidratos inapropiados podrían tener efectos negativos sobre la digestión del forraje debido a cambios en la fermentación ruminal. El pH ruminal, la digestibilidad de la fibra y la materia orgánica de otros componentes disminuyen por estos cambios (Tamminga, 1993; Philippeau et al., 1999). Sin embargo, estudios realizados en nuestro país (Cajarville et al., 2000) muestran que el pH medio ruminal se encuentra dentro de los niveles límite para el normal funcionamiento de la flora celulolítica en animales consumiendo praderas de buena calidad y suplementados con granos de trigo y sorgo.

Cuando se ofrecen SRE, existe una depresión parcial en la digestión de la fibra del forraje que puede contrabalancear el beneficio de agregar un alimento más digestible, y esto es sobretodo evidente cuando el forraje es de baja calidad (con excesos de fibra y deficiencias de proteínas), como en los estadios vegetativos tardíos. Con forrajes de alta calidad (fibra más digestible y excesos de proteína), como en los estadios vegetativos tempranos, este efecto no es tan evidente. En condiciones de forrajes de baja calidad, el proceso digestivo es más lento porque la estructura compleja de la fibra obliga a una secuencia de eventos gobernados por diferentes especies de bacterias en el rumen (Galyean & Goetsch, 1993). Cualquier interferencia por el agregado de SRE (por ejemplo, a través de una reducción del pH ruminal (Caton & Dhuyvetter, 1997) o porque las bacterias que digieren la fibra se desplazan al almidón), afectará negativamente el proceso de digestión de la fibra (incluso en suplementaciones muy bajas,

Cochran, 1998). En forrajes de baja calidad el agregado de SRE ha sido más perjudicial sobre la digestión de la fibra que sobre la reducción en el consumo de forraje (Jones et al., 1988). En estos forrajes los suplementos energéticos causan en general una depresión de la digestión de la fibra en mayor proporción que en los forrajes de alta calidad. Sin embargo, la depresión en el consumo de forraje por el uso de suplementos es menor en los forrajes de baja calidad que en los de alta calidad.

En los forrajes de alta calidad el proceso fermentativo es muy diferente al que ocurre con los de baja calidad. El forraje superior tiene un alto porcentaje de proteína y un menor contenido de fibra de gran complejidad, por lo que es de más fácil ataque bacteriano en relación al de baja calidad. En estas condiciones y para los niveles de suplementación normalmente utilizados, es bastante difícil que ocurra una depresión de la digestión de la fibra por el agregado de SRE (Sanson & Clanton, 1989). En estos forrajes el efecto de la suplementación será mayor sobre la reducción en el consumo de forraje (niveles de suplemento superiores al 25% de la ingesta total tienen efecto sustitutivo, Mathers & Miller, 1981) que sobre el proceso digestivo (Bowman & Sanson, 1996; Elizalde et al., 1999b).

Un elemento importante a tener en cuenta en el momento de evaluar los beneficios de una suplementación energética es la fuente y la forma del suplemento (melaza o granos, enteros o molidos (Chamberlain et al, 1985; Orskov & Fraser, 1975). La melaza ha sido frecuentemente utilizada en rumiantes como suplemento por su alta concentración energética (sacarosa) y palatabilidad (Hall, 2002). Stokes et al. (1991) demostraron un aumento de la producción de proteína microbiana a partir de la fermentación *in vitro* de azúcares, mientras que Sutton et al (2001) registran un aumento del consumo de MS de la dieta al incluir azúcares en la alimentación.

Los granos de cereales son la materia prima de elección para cubrir las necesidades energéticas en los rumiantes en producción debido a su alto valor energético y su gran palatabilidad (de Blas et al, 1995). Aunque todos los granos son oferentes de energía en forma de almidón, existen diferencias en la composición y la tasa de liberación del mismo en el tracto digestivo del animal. El almidón de los cereales de invierno es de rápida exposición, solubilidad y fermentación en el rumen (de Blas et al., 1995). En cambio, el de cereales de verano es de fermentación más lenta y una parte del mismo escapa a la fermentación ruminal, siendo digerida a nivel de intestino delgado.

La eficiencia de la fermentación ruminal del grano se incrementa en la medida en que se expone el almidón al licor ruminal. El procesado en molido o aplastado mejora la digestibilidad de los granos con respecto al ofrecido entero (Mc Allister et al., 1993). Algunos granos como los de cereales de invierno (trigo, cebada y avena) poseen almidón de mayor degradabilidad que los granos de verano (maíz y sorgo) por lo que su procesado no necesita ser tan severo. Sin embargo, cuando se suplementa sobre pasturas de alta degradabilidad (pasturas de otoño y verdes de invierno) el proceso fermentativo de ese forraje es rápido y el mejor complemento ocurre con granos molidos.

Si bien, en términos generales, se puede afirmar que la suplementación con alimentos energéticos mejora el aprovechamiento de nitrógeno excedente ofrecido por el verdeo o pastura, la pertinencia de esta suplementación dependerá de la calidad del forraje que se ofrezca como dieta base, del nivel y características de la suplementación y del balance entre el beneficio de un mayor aporte energético y los posibles desórdenes que esta suplementación provocaría sobre la fermentación ruminal.

CARACTERIZACIÓN DEL PROBLEMA E HIPÓTESIS

Las pasturas son el recurso más abundante y más económico utilizado por los sistemas productivos regionales, y como alimento base es capaz de mantener buenos niveles de productividad cuando es consumido *ad libitum* (Pulido et al, 2001). En condiciones de pastoreo es de particular importancia considerar: la calidad del forraje en relación a su estado vegetativo (temprano o tardío) (Beever & Siddons, 1986), el aporte constante de energía a los microorganismos (Ulyatt et al., 1975) y un posible desbalance entre la disponibilidad ruminal de los sustratos nitrogenados y energéticos (Van Vuuren et al., 1990).

En ciertas épocas del año (otoño e invierno) los forrajes en estados vegetativos tempranos se caracterizan por presentar un bajo contenido de materia seca además de relaciones bajas de CHO solubles/N, lo que puede llevar a grandes pérdidas de N por una reducida síntesis proteica microbiana (Beever, 1993; Elizalde et al., 1996, Trevaskis et al, 2001) que supone escasa utilización de amoníaco resultante de las fermentaciones. En estos casos la limitante para la producción de proteína microbiana no es el N sino la energía. Por lo tanto, para mejorar el aprovechamiento del nitrógeno es necesaria una suplementación energética que permita una mayor retención de N-NH₃ en el animal. La sustitución parcial y puntual de forrajes de alta calidad por moderadas cantidades de SRE (30 a 35% de MSI) ha sido sugerida para mejorar la sincronización entre energía y proteína en el rumen por un lado (Hungtington, 1997) y la fermentación ruminal por otro y de esa manera minimizar la pérdidas de N sin afectar la digestión de la fibra (Repetto et al., 2000; Bargo et al., 2003). Sin embargo, las repercusiones de la suplementación energética sobre el ambiente ruminal (variaciones de pH y N-NH₃, alteración de la digestibilidad de la fibra y MO) y su posterior impacto sobre la síntesis proteica microbiana deben ser tenidos en cuenta para no alterar la productividad del rumiante. Las consecuencias positivas o negativas de la suplementación energética dependerán, en cierto grado, de la calidad del forraje base suministrado (estado vegetativo tardío o temprano).

La *hipótesis* que sustenta nuestro trabajo puede enunciarse de la siguiente forma: la suplementación de la pastura con carbohidratos fácilmente fermentescibles, administrados de forma de sincronizar su aporte de energía con la liberación del N, mejorará la captación de éste por los microorganismos ruminales favoreciendo la síntesis proteica microbiana, sin comprometer la función ruminal, con independencia del estado vegetativo del forraje.

OBJETIVOS

Objetivo general: Cuantificar el efecto de la suplementación energética y del tipo de suplemento suministrado sobre la digestión ruminal y el aprovechamiento del nitrógeno de la dieta en ovinos alimentados con pasto fresco en dos estados vegetativos

Objetivos particulares: Determinar el efecto de la suplementación energética con grano de cebada solo y con grano de cebada más melaza sobre:

- la digestibilidad del alimento,
- el pH y el amoníaco ruminales
- la síntesis proteica ruminal
- la uremia y su eliminación

cuando el régimen de base es:

- a) pasto fresco en estado vegetativo tardío
- b) pasto fresco en estado vegetativo temprano

MATERIALES Y MÉTODOS

El protocolo experimental se desarrolló en el Campo Experimental N° 2 de la Facultad de Veterinaria y los diferentes métodos analíticos en los laboratorios de Departamentos de Nutrición Animal y de Fisiología.

Animales y regímenes alimenticios

Se utilizaron 18 ovinos Corriedale, hembra, no gestantes, no lactantes entre 38 y 51 Kg de peso. Para permitir el efecto social sobre el comportamiento alimentario (Denton, 1957) los animales se alojaron durante todo el transcurso del trabajo en 2 baterías de 9 jaulas metabólicas cada una, dentro de un galpón que las preservaba de las variaciones climáticas. El cuidado y el manejo de los animales, así como la implantación de catéteres yugulares, cánulas ruminales y vesicales se efectuaron bajo protocolos aprobados por la Comisión de Vigilancia de la Etica en Experimentación Animal de la Facultad de Veterinaria.

La dieta base suministrada a los animales consistió en forraje de pradera templada implantada, 90% de gramíneas (*Avena sativa*) y trébol blanco (*Trifolium repens*) en dos estadios vegetativos: tardío (encañado) y temprano (30 días de rebrote). La suplementación se realizó con grano de cebada (*Hordeum vulgare*) quebrado y melaza deshidratada (derivada de caña de azúcar: Kalori 3000®, KK Animal Nutrition Pty Ltd., Sud Africa). La composición química del alimento se describe en la Tabla V.

Tabla V: Composición química del alimento consumido durante los ensayos experimentales

	Kg MS/há	%MS	%MO*	%Cen*	%FND*	%FAD*	%PB*	%AS*
Forraje Tardío	6240	15,90	88,97	11,30	55,45	29,63	11,62	4,70
Forraje temprano	3040	14,81	87,71	12,29	54,62	27,87	14,86	8,17
Cebada	-	92,41	96,82	3,18	16,11	6,01	8,74	5,30
Melaza**	-	97,02	62,67	37,33	0,86	0,05	8,53	25,00***

*: Datos expresados en base a materia seca. AS: azúcares solubles. ** Kalori 3000® (46,9% melaza de caña de azúcar + 46,9% de condensados de melaza solubles + 6,2% hidróxido de calcio). *** Dato proporcionado por el fabricante

Los animales fueron divididos en tres grupos al azar (n = 6) asignándole un régimen alimenticio a cada uno: Grupo F (forraje, 100%), FG (forraje 70% + grano 30%) y grupo FGM (forraje 70% + grano 15% + melaza 15%). Para cada grupo se hicieron dos ensayos, uno con forraje en estado vegetativo tardío (ensayo 1, E1), y otro en estado vegetativo temprano (ensayo 2, E2). El forraje ofrecido fue cortado diariamente y siempre por las mañanas, a efectos de evitar el aumento vespertino de los CHO. Luego fue pesado y distribuido cuatro veces al día en los siguientes horarios: 9, 13, 18 y 23 hrs. adicionándose el suplemento dos veces al día, a las 9 y las 18 hrs.

La composición de la dieta para los tres grupos y los dos ensayos experimentales se detalla en la tabla VI

El consumo se restringió a niveles de mantenimiento a razón de 40 g MS/kg PV^{0,75}. Se llevó registro diario de las cantidades de alimento ofrecido y rehusado.

Tabla VI: Composición química de cada dieta experimental para ambos ensayos experimentales (E1 y E2)

	Grupo	% MO	% PB	%CHNF	% FND	% FAD
E1	F	88,97	11,62	19,20	55,45	29,63
forraje tardío	FG	91,32	10,76	34,46	43,65	22,55
	FGM	86,20	10,73	31,93	41,36	21,65
E2	F	87,71	14,86	15,53	54,62	27,87
forraje temprano	FG	90,44	13,03	31,89	43,07	21,31
	FGM	85,32	12,99	29,36	40,78	20,42

Protocolo experimental (Figura 4)

Cada ensayo experimental (E1 y E2) comenzó con 10 días de adaptación de los animales a las dietas. Durante los 5 días siguientes se realizaron los estudios de digestibilidad, producción de proteína microbiana (PM) y funcionalidad renal. Para el muestreo sanguíneo se colocaron catéteres yugulares (día 12 en E1, día 28 en E2) y para el muestreo de orina se emplearon sondas vesicales con balón de retención conectados a una bolsa de recolección para impedir la mezcla de la orina con las materias fecales. Finalizados estos estudios se procedió a la colocación de cánulas ruminales (día 31). *Protocolo anestésico quirúrgico:* Se sedaron los animales con xilacina (0,05 mg/kg, iv, Rompun®, Bayer) luego se realizó una anestesia regional paravertebral con lidocaína al 2 % (Lidocaina Fatro) y suplementación anestésica (dosis de rescate analgésico) con ketamina (Vetanarcol®, Koning, 50 mg/kg iv). Posteriormente se efectuó una ruminostomía permanente por laparotomía estrellada por el flanco izquierdo. Se practicó una ruminotomía de 3 cm por donde se introduce un tubo de polietileno de 1 cm de ancho y 20 cm de longitud con el extremo ruminal cubierto por una pequeña bolsa de poros pequeños que permite la aspiración del líquido ruminal sin partículas groseras. Luego se fijó el tubo a la pared ruminal mediante una sutura en jareta con nylon 2-0, el extremo libre se aboca al exterior por una incisión caudal al herida laparotómica y se fija piel mediante una sutura en tampa de dedos china. Finalmente se instauró un tratamiento analgésico-antiinflamatorio con fenilbutazona (5 mg/kg, iv, Fenilbutazona®, Nayborg) y antibioticoterapia con penicilina esptrepto (20.000 UI/kg, im., penicilina estrepto®, Proagro).

Luego de 5 días de realizada la intervención quirúrgica y durante 24 horas se extrajeron muestras de líquido ruminal para la determinación de pH y la concentración de NH₃.

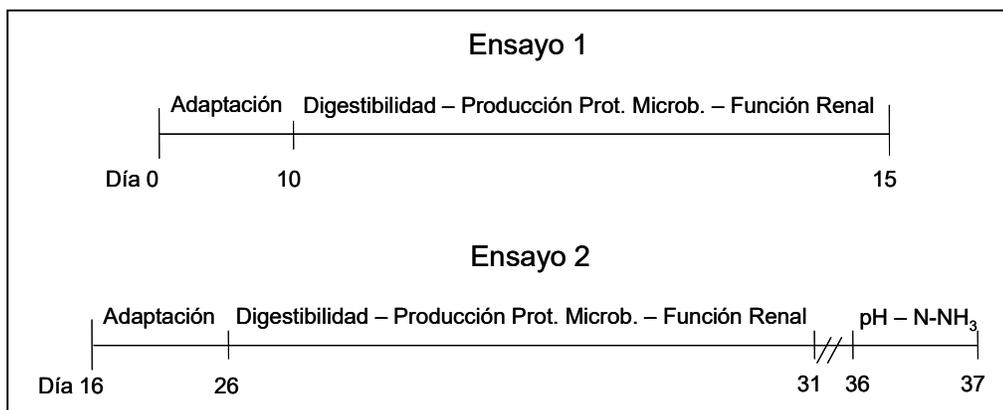


Figura 4: Esquema del desarrollo temporal del protocolo experimental

Funcionalidad ruminal

Para los estudios de *digestibilidad* se midieron las cantidades totales de heces y orina diarias. Una muestra del 10% de las heces diarias y una alícuota de 30 ml de orina se almacenaron a -20° hasta su posterior procesamiento. Muestras representativas del alimento ofrecido a los animales en cada tratamiento (y del rehusado (cuando éste superó el 10% de lo ofrecido) fueron almacenadas diariamente para su posterior estudio en forma conjunta. Con el fin de calcular los respectivos coeficientes de digestibilidad las muestras de alimento, rehusados y heces fueron analizadas para: MS (secado en mufla a 105°C), MO y PB (según A.O.A.C., 1984). Las determinaciones de FND y FAD se realizaron siguiendo la técnica propuesta por Goering & Van Soest (1970). Utilizando la técnica descrita por Yemm & Willis (1954) se determinó el contenido de carbohidratos solubles de la pastura. Utilizando los coeficientes de digestibilidad de la materia orgánica y las cantidades de materia orgánica ingerida se calculó la *Materia Orgánica Digestible Ingerida (MODI)* como el coeficiente de digestibilidad de la MO x MO ingerida (g). La *Materia Orgánica aparentemente Digestible en Rumen (MODR)* se calculó como 65% de la MODI (ARC, 1984)

La producción de proteína microbiana se evaluó mediante la técnica de cuantificación de la eliminación urinaria de alantoína. Los ácidos nucleicos que llegan al duodeno son degradados enzimáticamente, y sus derivados son absorbidos, metabolizados y excretados en la orina. La alantoína es uno de los derivados púricos que se encuentra en mayor proporción. Esta particularidad del metabolismo de las bases púricas y su riqueza en la población bacteriana, hacen posible la estimación indirecta de la absorción de proteína bacteriana a nivel intestinal mediante la cuantificación de la alantoína en orina. Una de las grandes ventajas de este método es que no requiere la utilización de animales doblemente fistulados (en rumen y duodeno). Por otra parte, el análisis de la alantoína es muy rápido, preciso y apropiado para gran número de muestras (Pérez et al., 1997)

Para la cuantificación de alantoína se colectó diariamente sobre un conservante (solución de ácido sulfúrico al 10%) la totalidad de la orina emitida de la cual se tomó una alícuota de 30 ml. En ésta se dosificó la alantoína por el método colorimétrico de Young & Conway, modificado por Fujihara (1987). En este procedimiento, la alantoína es primero hidrolizada bajo una débil condición alcalina a 100° C a ácido alantoico, el cual es hidrolizado a urea y ácido glioxílico en una solución ácida débil. El ácido glioxílico reacciona con fenilhidrazina hidroclicórica para producir fenilhidrazona derivada del ácido. Este producto forma un cromóforo inestable con ferrocianuro de potasio cuya lectura se hizo por espectrofotometría (espectrofotómetro UV-1203 Shimadzu) a 522 nm. La producción de proteína microbiana se calculó, a partir del N de alantoína eliminado en la orina, utilizando la fórmula propuesta por Puchala & Kulasek (1992):

$$y = e^{(0,830 + 2,089x)}$$

donde “y” representa el N microbiano (g/d) que llega al duodeno y “x” la eliminación de N de alantoína (g/d).

La eficiencia de síntesis de proteína microbiana (ESM) en rumen fue estimada a partir de los g de N microbiano por kg de MODI y/o MODR.

El pH y N-NH₃ ruminales se determinaron solamente en el ensayo 2, sobre muestras de líquido ruminal (1 por animal por hora) obtenidas a través de la cánula ruminal durante 24 h. Inmediatamente de extraída la muestra se determinó el pH (pHmetro digital, EW-05991-36, Cole Parmer, USA). El N-NH₃ ruminal fue analizado en una alícuota de 10 ml de líquido ruminal conservada en 10 ml de cloruro de sodio al 20%, por destilación directa con tetraborato de sodio.

Funcionalidad renal y eliminación de urea

La mayor parte de los métodos utilizados para el estudio de la funcionalidad renal están basados en el principio de la depuración plasmática (clearance) de una sustancia. Este principio establece que la cantidad teórica de sangre completamente depurada de una sustancia X por unidad de tiempo es igual a la cantidad de esa sustancia eliminada con la orina en el mismo tiempo. Conociendo la cantidad de la sustancia X eliminada en la orina (concentración urinaria de X [U_x] por el volumen en el cual se emitió (diuresis, [V]) y su concentración plasmática (P_x) se puede establecer el volumen de plasma que fue totalmente depurado (C_x) por unidad de tiempo mediante la siguiente fórmula:

$$C_x \text{ (ml/min)} = [U_x \text{ (mg/ml)} \times V \text{ (ml/min)}] / P_x \text{ (mg/ml)}$$

El manejo renal de la urea se estudió mediante la determinación del clearance de la urea (Cu), el flujo de filtración (FFG, calculado mediante la depuración de un indicador endógeno, la creatinina), la carga filtrada de urea

(cantidad de urea que filtra ingresando al nefrón, calculada como el producto de la uremia x FFG) y la tasa de eliminación de urea (TEu, proporción de la urea filtrada que es eliminada con la orina, calculada como Cu/FFG).

Estudio estadístico

Los parámetros ruminales pH y N-NH₃ se analizaron como medidas repetidas, usando un modelo mixto (procedimiento mixto del SAS) incluyendo los efectos tratamiento, hora y la interacción tratamiento x hora. Los resultados de la digestibilidad de MS, MO, PB, FAD y FND se compararon entre tratamientos para cada uno de los ensayos experimentales y para ambos ensayos conjuntamente, utilizando contrastes ortogonales; separando los efectos de la suplementación y del tipo de suplemento utilizado. Cuando se realizaron los contrastes para ambos ensayos experimentales se consideró el efecto ensayo. Los dos ensayos experimentales también fueron evaluados para estos parámetros por tests “t” de Student. La producción de proteína microbiana, la eliminación de urinaria de alantoína, la funcionalidad renal y la eliminación de urea fueron evaluadas por tests “t” de Student para cada ensayo experimental. Se utilizaron tests “t” de Student para series apareadas para los mismos parámetros para comparar entre ensayos experimentales.

RESULTADOS

Digestibilidad

En la Tabla VII se presentan los coeficientes de digestibilidad medios para MS, MO, PB, FND y FAD para las tres dietas y en ambos ensayos. En el E1 la digestibilidad de la MS y de la MO fue mayor en los grupos suplementados, pero no hay diferencias significativas entre ambos. En la digestibilidad de la PB hay diferencias significativas ($P < 0,05$) entre los grupos suplementados, siendo esta mayor en el grupo FG. Sin embargo no aparecen diferencias entre suplementados vs grupo F. La digestibilidad de la FAD y la FND, no se vio afectada por la suplementación. En el E2 la digestibilidad de MS y de la MO fueron mayores en el grupo FG. Entre los grupos suplementados sí se encontraron diferencias significativas para la digestibilidad MS siendo ésta mayor para el grupo FG. No se ven diferencias en la digestibilidad de la PB y FAD pero la digestibilidad de la FND fue menor para los grupos suplementados.

Cuando comparamos ambos ensayos no hay diferencias significativas para la digestibilidad de MS entre ninguno de los tres tratamientos, sin embargo se observa un incremento significativo en la digestibilidad de MO para las tres dietas en E2. De la misma forma encontramos un aumento de la digestibilidad de la PB en los grupos F y FGM en el ensayo 2, así como un incremento en la digestibilidad de FDN para el grupo F.

Tabla VII: Coeficientes de Digestibilidad de MS, MO, PB, FAD, FND para los tres grupos experimentales (F = forraje, FG = forraje + grano, FGM = forraje + grano + melaza) en ambos ensayos (E1 = estado vegetativo tardío y E2 = estado vegetativo temprano).

	E1				E2			
	F	FG	FGM	ES	F	FG	FGM	ES
MS	0,67	0,72*	0,71*	0,011	0,71	0,75* ^a	0,71	0,012
MO	0,68	0,74*	0,72*	0,010	0,75 ^b	0,79 ^{a,b}	0,75 ^b	0,011
PB	0,71	0,72 ^a	0,68	0,010	0,74 ^b	0,74	0,73 ^b	0,015
FAD	0,58	0,55	0,57	0,025	0,61	0,60	0,56	0,020
FND	0,66	0,61	0,64	0,021	0,73 ^b	0,68*	0,66*	0,018

* P < 0,05 intraensayo con respecto a F, ^a P < 0,05 intraensayo entre grupos suplementados, ^b P < 0,05 entre ensayos para el mismo grupo experimental. ES = error standard

En la Tabla VIII se muestran los distintos coeficientes de digestibilidad cuando se toman ambos ensayos en conjunto. La digestibilidad de la MS y la MO fue superior en los grupos suplementados, existiendo diferencias entre FG y FGM donde la digestibilidad de la MS fue mayor en los animales suplementados con grano. La digestibilidad de la PB y la FAD no se ve afectada por la suplementación. Sin embargo, se encontró una digestibilidad aumentada de la FND en el grupo que consumió solo forraje

Tabla VIII: Coeficientes de Digestibilidad de MS, MO, PB, FAD, FND para los tres grupos experimentales (F = forraje, FG = forraje + grano, FGM = forraje + grano + melaza) en ambos ensayos (E1 = estado vegetativo tardío y E2 = estado vegetativo temprano) tomados en conjunto

	F	FG	FGM	EE
MS	0.69	0.74*	0.71*	0.013
MO	0.72	0.77* ^a	0.74	0.015
PB	0.73	0.73	0.70	0.014
FAD	0.60	0.57	0.57	0.023
FND	0.70	0.65*	0.65*	0.022

* P < 0,05 con respecto a F, ^a P < 0,05 entre suplementos. EE = error estandard

pH

En la tabla IX se presentan los valores de los pH (medios y rangos obtenidos en el ensayo encontrándose diferencias significativas entre tratamientos, así como para las distintas horas del día dentro de cada grupo. Inesperadamente, el valor promedio más alto de pH se halló en el grupo FGM.

Tabla IX: Valores medios y rangos de pH ruminal para los tres grupos (F = forraje, FG = forraje + grano, FGM = forraje + grano + melaza) en E2 (estado vegetativo temprano)

	F	FG	FGM	EE	P		
					t	h	t x h
pH	6.33 ^b (6,07-6,59)	6.15 ^c (5,92-6,53)	6.51 ^a (6,24-6,75)	0.0354	<0.001	<0.001	ns

EE: error estándar, P: probabilidad estadística, t: efecto tratamiento (suplementados vs no suplementados), h: efecto hora, t x h: interacción entre tratamiento y hora, ns: no significativo. Los superíndices indican las diferencias significativas (P<0.001).

La evolución horaria del perfil del pH para los tres grupos experimentales se observa en la Figura 5. En líneas generales los tres grupos presentan tendencias similares.

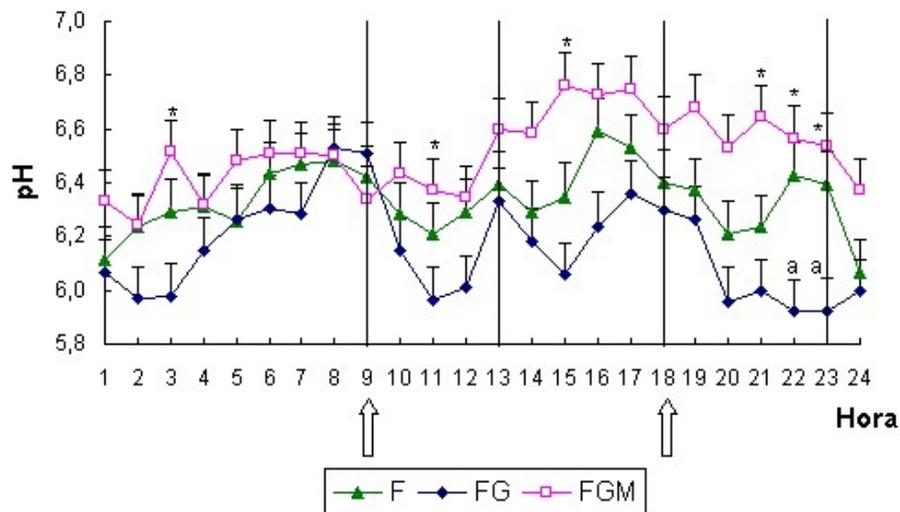


Figura 5. Evolución del pH medio para los tres grupos experimentales (F = forraje, FG = forraje + grano, FGM = forraje + grano + melaza) durante 24 h. * P<0,05 entre suplementos. ^a P<0,05 entre FG y F (Las líneas indican los horarios de suministro de alimento, las flechas el suministro de suplementación).

En los grupos F y Fg el pH desciende luego de las ingestas y en el FG los descensos más importantes aparecen luego de la distribución del suplemento. En el grupo FGM los valores de pH se mantienen casi permanentemente durante las 24 h por encima de aquellos de los otros dos grupos restantes, sin que se observen claras disminuciones post-prandiales.

Nitrógeno amoniacal

Los valores medios de la concentración de N-NH₃ presentados en la tabla X, no presentan diferencias significativas entre tratamientos, ni entre las distintas horas de muestreo para un mismo tratamiento, pero sí se

registraron variaciones significativas entre concentraciones de N-NH₃ para los diferentes grupos respecto a la misma hora del día (interacción tratamiento x hora) (Figura 6).

Tabla X: Valores medios de concentraciones de N-NH₃ (mg/dL) en el líquido ruminal para los tres grupos experimentales (F = forraje, FG = forraje + grano, FGM = forraje + grano + melaza).

	F	FG	FGM	ES	P		
					t	h	t x h
N-NH ₃ (mg/dL)	17.4	18.5	18.0	0.8	ns	ns	<0.001

ES: error estándar, P: probabilidad estadística, t: efecto tratamiento, h: efecto hora, t x h: interacción entre tratamiento y hora, ns: no significativo.

No se hallaron importantes fluctuaciones en la concentración de N-NH₃ a lo largo de 24 h en ninguno de los tratamientos, ubicándose la mayoría de las mediciones entre 15 y 20 mg/dl (Figura 6). Sólo algunos picos fueron superiores a 25 mg/dl, pero en distintos momentos según el tratamiento y no relacionados con el suministro de la ración. El pico mayor de N-NH₃ se observó en el grupo FGM una hora post ingestión de forraje.

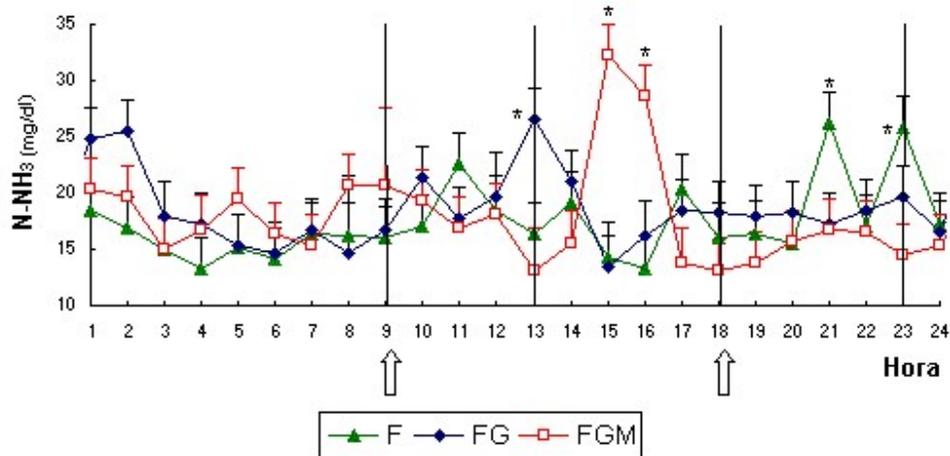


Figura 6. Evolución de la concentración media de N-NH₃ (mg/dL) para los tres grupos experimentales (F = forraje, FG = forraje + grano, FGM = forraje + grano + melaza) durante 24 h.

* P<0,05 interacción t x h. (Las líneas indican los horarios de suministro de alimento, las flechas el suministro de suplementación).

Eliminación urinaria de alantoína, producción de proteína microbiana y eficiencia de síntesis microbiana

Los valores de eliminación urinaria de alantoína, producción de proteína microbiana y de eficiencia de síntesis microbiana en función de MODI y MODR se indican en la Tabla XI para los dos ensayos

experimentales. No hubieron diferencias significativas entre tratamientos para ninguno de los parámetros señalados tanto en E1 como en E2, aunque se observa una tendencia al aumento de todos ellos durante E2 para los tres grupos experimentales.

Tabla XI: Eliminación urinaria de alantoína (mmol/d), producción estimada de proteína microbiana (PM, g/d) y eficiencia de síntesis microbiana (ESM, g N/Kg de MODI, MODR) para los tres grupos (F = forraje, FG = forraje + grano, FGM = forraje + grano + melaza) en ambos ensayos (E1 = estado vegetativo tardío y E2 = estado vegetativo temprano)

	E1			E2		
	F	FG	FGM	F	FG	FGM
MODI (g/d)	411±40	458±36	442±29	441±47	489±67	471±22
MODR (g/d)	267±25	298±23	287±18	286±30	318±43	306±14
Alantoína	7,7±1,2	8,7±1,0	8,9±1,0	10,5±1,3	10,4±1,6	9,9±1,3
PM	6,2±0,8	7,0±1,6	6,5±1,1	8,9±1,05	8,6±2,2	8,3±2,2
ESM						
g N/Kg MODI	15,3±1,2	15,0±1,8	14,6±2,1	19,5±2,4	18,2±4,7	17,7±4,3
g N/Kg MODR	23,5±1,9	23,1±2,8	22,5±3,3	30,0±3,7	28,1±7,3	27,2±6,6

Valores = medias ± DS, n = 6

Función renal y manejo de la urea por el riñón

En la tabla XII se presentan los valores de uremia y de los parámetros renales involucrados en el manejo de la urea por el riñón.

Tabla XII: Uremia y manejo renal de la urea en los tres grupos experimentales durante ambos ensayos (E1 y E2). (FFG = flujo de filtración glomerular, Cu = Clearance de urea, CFu = carga filtrada de urea, U = eliminación urinaria de urea, TEu = tasa de eliminación de urea).

	E1			E2		
	F	FG	FGM	F	FG	FGM
Uremia (mg/mL)	0,24±0,03	0,32±0,02 ^{abc}	0,22±0,02	0,27±0,03	0,25±0,05	0,25±0,04
Diuresis (mL/min)	1,56±0,33	1,2 ±0,02	1,5 ±0,3	2,21±0,04 ^c	1,5±0,03 ^a	1,82±0,03 ^{ab}
FFG (mL/min)	52,5±10,8	62,3±3,0	66,9±17,3	80,2±4,5 ^c	79,4±5,7 ^c	75,3±3,1
Cu (mL/min)	21,9±1,9	21,7±1,2	22,0±0,6	38,4±5,7 ^c	38,3±6,1 ^c	30,95±4,6 ^c
CFu (mg/min)	12,5±2,7	17,4±1,3 ^a	15,0±4,0	21,9±4,3 ^c	21,9±2,6 ^c	21,4±2,7
U (mg/mL)	3,7±0,9	5,1±2,4	3,5 ±0,6	4,2±1,2	5,9±0,2	4,3±0,5
TEu	0,43±0,11	0,35±0,02	0,35±0,1	0,48±0,09	0,54±0,04 ^{bc}	0,41±0,07

^a = P<0,05 entre tratamientos del mismo ensayo, en referencia al grupo no suplementado (F) (test "t" Student), ^b = P<0,05 entre grupos suplementados (FG y FGM) para el mismo ensayo (test "t" Student), ^c = entre ensayos para un mismo tratamiento (test "t" Student series apareadas). Valores = Media ± DS. n = 6

La uremia y la carga filtrada de urea se encuentran aumentadas en el grupo FG durante E1 con respecto a los grupos restantes, manteniendo valores similares en los tres grupos durante E2. El FFG, el Cu y la TEu fueron similares para los tres grupos experimentales durante E1, con tendencia a incrementarse durante E2.

DISCUSIÓN

Digestibilidad

La digestibilidad para MS (DMS) en los ensayos realizados no varió según el estado vegetativo del forraje, aunque se observa una tendencia a mayores valores con forraje en estado vegetativo temprano. Contrariamente la digestibilidad para MO (DMO) aumentó en E2. Estos resultados pueden atribuirse según Minson (1981) y Jung & Allen, (1995) a un menor contenido en lignina, lo cual favorece la degradabilidad de los elementos contenidos en la pared celular.

Los efectos de la suplementación energética sobre la digestibilidad variaron dependiendo de la calidad del forraje. Es así que la suplementación energética durante E1, aumentó levemente la DMS y la DMO (6,7% y 7,4% respectivamente). Este resultado concuerda con el de Sanson (1993) donde halló una DMO incrementada en ovinos alimentados con henos de baja calidad y suplementados con maíz. Similares resultados se encuentran en la revisión hecha por Poppi & McLennan (1995). Broderick & Radloff (2004) también hallaron una DMS y DMO aumentada cuando suplementaron con melaza vacas en lactancia, alimentadas con alfalfa y silo de maíz.

Durante el E2 se encuentra un aumento de la DMS cuando la ración se complementa con grano aunque menor que en el E1 (2,8%). A su vez hubo un comportamiento diferencial entre los grupos suplementados, donde el grupo FG presentó mayores DMS y DMO que el FGM (5,6% y 5,3% respectivamente). Esta diferencia podría atribuirse al hecho de que la adición de un sustrato rápidamente fermentescible como la melaza, deriva hacia él la actividad enzimática de los microorganismos, tal como lo sugieren los trabajos de Obara et al. (1991) y Russell et al. (1983). En este mismo ensayo la digestibilidad de la FND (DFND) disminuyó con la adición de suplementos energéticos. La depresión en la digestibilidad de la fibra ha sido reportado por Jones et al (1988) con la suplementación de granos al 0.3% de peso vivo y en forrajes con alto contenido de fibra (79% de FND). Dentro de un amplio rango de forrajes de diferente calidad, la depresión en la digestión del forraje con la adición de granos aumenta cuando el contenido en fibra aumenta o la calidad del forraje disminuye, tal vez porque la flora celulolítica contribuye más en la fermentación de forrajes de baja calidad que en los de mejor calidad (Galyean & Goetsch, 1993). Sin embargo la FND durante el E2 se sitúa en el orden del 40% lo que indica que es un forraje de buena calidad.

Si bien en este trabajo, hubo una disminución global de la digestibilidad total de la FND (8% en ambos ensayos) al utilizar suplementos, esta depresión no fue tan profunda como la descrita por Staples et al. (1984) quien al suplementar con granos obtuvo una reducción de la digestión de la celulosa de 20 a 55% con respecto al grupo testigo no suplementado.

En líneas generales, los resultados de distintos autores en referencia al impacto de la suplementación energética sobre la digestibilidad de MS, MO y FND no son concordantes. Elizalde et al. (1999) en estudios en novillos alimentados con forrajes de buena calidad y distintos niveles de suplementación con grano, observaron un aumento del 71,2 a 76,2 % DMO, con relación al nivel de suplementación sin encontrar diferencias en la digestibilidad de la FND. En trabajos *in vitro*, Bach et al. (1999), registraron aumentos en la DMS y en la DMO, y una disminución de la DFND, con el agregado de suplementos energéticos a dietas basadas en pasturas de buena calidad. Brown (1990) observó que en animales alimentados con pasturas y suplementados con 25% de melaza la DFND disminuyó un 5%, mientras que la DMO se incrementó un 5,7%, resultados que se asemejan a los del presente trabajo. Sin embargo, Berzaghi et al. (1996), demostraron que la suplementación energética con grano de maíz quebrado provoca una disminución de la DMO en vacas lecheras alimentadas a base de pasturas frescas de buena calidad, disminuyendo también la DFND.

En conclusión, en líneas generales la suplementación energética, sobre todo cuando se hizo a base de grano sólo, mejoró la DMS y DMO en ambos ensayos independientemente de la calidad del forraje.

pH

Owens & Goetsch (1988) determinaron que el rango óptimo de pH para rumiantes consumiendo dietas basadas en forraje es de 6,2-7. Los valores promedio de pH ruminal obtenidos en este trabajo para el grupo F se encontraron razonablemente dentro de dicho rango. Estos valores también coinciden con los obtenidos en otros estudios en ovinos a pastoreo en nuestro país (Cajarville et al., 2006) y en bovinos en regiones tropicales (Abarca et al., 1999).

El pH medio obtenido para animales suplementados con grano fue significativamente menor al obtenido para aquellos consumiendo sólo pasturas y se encuentra dentro del rango indicado por Owens & Goetsch (1988) para animales consumiendo concentrados energéticos (5,85 a 6,66). Además es similar al encontrado por Elizalde et al (1999) en bovinos alimentados con alfalfa y suplementados con maíz. Este resultado concuerda por otra parte con la mayoría de los ensayos realizados por autores que utilizaron suplementación con grano de maíz y/o cebada (Staples et al., 1984, Berzaghi et al., 1996; Repetto et al., 2000).

Un resultado inesperado se encontró con el grupo suplementado con grano y melaza (FGM). Si bien el pH de este grupo se mantuvo dentro de valores referenciales, adecuados para la actividad microbiana, superó al de los otros grupos. En dietas basadas en forrajes suplementadas con azúcares (Chamberlain et al., 1993) o melaza (Broderick & Radloff, 2004) los pH medios ruminales se sitúan en el orden de 5,9 – 6,25, sensiblemente más bajos que los encontrados en este ensayo. Una explicación posible para este resultado podría buscarse en el proceso de elaboración del producto utilizado en este trabajo como fuente de azúcares (Kalori 3000®). En este proceso se utiliza hidróxido de calcio, al igual que en la deshidratación de la pulpa de cítricos, para aumentar el pH y facilitar su procesado (Calsamiglia et al., 2004). Este elemento actuaría como buffer alcalinizando el líquido

ruminal. De hecho, el hidróxido de calcio al 20% ha sido utilizado como tratamiento de la acidosis ruminal aguda en bovinos (Renner et al., 1991).

La evolución diaria del pH ruminal, no mostró descensos abruptos luego del suministro del alimento. En la literatura la mayoría de los autores reportan caídas de pH importantes y sostenidas luego de la ingesta. En trabajos realizados en nuestro país con pasturas de composición similar a la suministrada en este ensayo, pero con un régimen de alimentación restringida (una vez al día durante 4 horas), se observaron descensos importantes de pH posteriores a la ingesta (Pérez et al., 2006). Del mismo modo, Chamberlain et al., (1993) con un régimen de alimentación de dos comidas diarias (8 y 16 hr) detectan caídas post prandiales de pH que se mantienen por 6 horas.

French & Kennelly (1990) y McLeod et al., (1994) establecen que el aumento en la frecuencia de distribución de los alimentos minimiza la amplitud de las variaciones post ingesta del pH, sobretodo cuando la ración es rica en elementos rápidamente fermentescibles. El resultado obtenido en este ensayo entonces, podría atribuirse al aporte frecuente de sustratos (cuatro comidas diarias, dos de las cuales contienen suplementos energéticos) en donde las fluctuaciones del pH son poco notorias. De todas formas, y salvo para el grupo FGM, los mayores descensos del pH ruminal se registraron dentro de las 3 horas post ingesta. Los registros más bajos correspondieron al grupo FG. La dieta FG contiene cebada cuyo almidón es de alta y rápida fermentescibilidad lo que promovería una producción aumentada de AGV disminuyendo el pH por la mayor carga ácida (Marshall et al., 1992; Voelker & Allen, 2003). En este grupo los mayores descensos del pH ruminal a partir de la ingesta coinciden con la distribución del suplemento (9 y 18 h) lo que concuerda con diferentes autores que registran este perfil de reducción de pH en la suplementación con grano (Marshall et al., 1992; Caton & Dhuyvetter, 1997; Voelker & Allen, 2003; Cajarville et al., 2006).

En las horas más lejanas al suministro del alimento, los tres grupos tienden a igualar sus niveles de pH, siendo más alcalinos, con valores que van de 6,4 a 6,6. Si bien en este ensayo no se midió la producción de AGV, esto podría deberse a la absorción de estos ácidos producidos, junto a una disminución en su síntesis. Otro factor a tener en cuenta es el ingreso de sustancias tampón a través de la saliva de rumia, que generalmente ocurre en horarios cercanos a la administración del alimento. Este fenómeno también fue observado en trabajos realizados en nuestro país por Cajarville et al (2000) en bovinos alimentados con forraje y suplementados con trigo y maíz.

El grupo FGM presentó los valores de pH más altos sin que se detectara un descenso inmediato del mismo luego de la ingesta, presentando incluso aumentos pre y post ingestión. Apoyándonos en el contenido de sales de calcio que contiene la melaza (6%), suponemos que este efecto es debido a la acción buffer de este componente. Varios autores (Grummer, 1988; Schauff et al 1989; Schneider et al. 1988) sugieren que el calcio es inerte y de baja solubilidad a nivel ruminal por lo que no alteraría la fermentación. Sin embargo, Klusmeyer et al, (1991) estudiando el efecto de las sales de calcio de ácidos grasos sobre la fermentación hallaron un aumento del pH ruminal cuando los animales eran alimentados con esta sal.

Rearte & Santini (1989) constataron un leve aumento de pH ruminal luego del consumo de forraje tratado con bicarbonato de calcio.

Kaufmann et al. (1980) y Van Soest (1994) establecen que los valores críticos para el mantenimiento de la actividad celulolítica se ubicarían en torno a mínimos de 6,0 - 6,2. Hoover et al. (1984) reportan que descensos de pH por debajo de 6 provocan una pérdida de la actividad celulolítica, con completa cesación de la digestión de la fibra entre valores 4,5 y 5. A su vez, Calsamiglia et al. (2002) introducen el concepto de que la viabilidad de la flora celulolítica reposa más en el tiempo en el cual se mantienen por debajo de valores críticos que en la magnitud del descenso de los valores de pH, estableciendo un lapso de 12 horas para un compromiso crítico de la sobrevivencia de la flora. En nuestro estudio, los descensos de pH, tanto en magnitud como en duración, no estarían afectando la actividad de la flora celulolítica ya que los valores de pH medios menores a 6 se observaron únicamente en el grupo FG dentro de las 4 y 5 horas posteriores al suministro del suplemento durando aproximadamente dos horas diarias. Este resultado concuerda con los de Silveira et al (2007) quienes estudiando dos tipos distintos de cebada en la suplementación de vacas lecheras obtuvieron un rango de pH (6,05 – 6,19) similar al de este trabajo y la duración del descenso de este parámetro ($\text{pH} < 5,8$) se situó entre 3 y 8 h, disminuyendo el tiempo de mantenimiento de pH a medida que éste decrecía.

En conclusión, con el nivel de suplementación energética que se utilizó en este ensayo los valores de pH se mantuvieron dentro de rangos fisiológicos tanto en intensidad como en duración, no afectando la fermentación ruminal.

Nitrógeno amoniacal

Las concentraciones medias de N-NH_3 en líquido ruminal obtenidas en este estudio para los tres tratamientos se encuentran dentro del rango establecido por Satter & Slyter (1974), Boniface et al., (1986) y Berzaghi et al., (1996), quienes concuerdan que niveles entre 5-20 mg/dL de N-NH_3 no son limitantes para la síntesis de PM.

Entre los tres tratamientos no se registraron diferencias significativas en la concentración media de N-NH_3 . En la mayoría de la bibliografía consultada la suplementación energética reduce la concentración de N-NH_3 ruminal, a través de una mayor captura de N por los microorganismos y su posterior utilización en la producción de proteína microbiana. (Van Vuuren et al., 1986; Van Vuuren et al., 1993; Berzaghi et al., 1996). Sin embargo, Wiedmeier et al. (1992) en un ensayo en el cual se comparaba el efecto de la melaza contra un subproducto de la misma sobre la digestibilidad de los nutrientes y la fermentación ruminal en bovinos alimentados con heno obtuvo concentraciones de N-NH_3 similares a las de este trabajo, sin diferencias significativas entre tratamientos. En estudios realizados por Kim et al. (2005), perfusiones intrarruminales de sucrosa en ovinos alimentados con ensilado de forraje, no indujeron disminuciones en los valores de N-NH_3 con respecto a la dieta basal sin suplementación.

En referencia a la evolución diaria de la concentración de N-NH_3 no se observaron variaciones importantes asociadas al suministro del alimento en

ninguno de los tratamientos realizados. Esto difiere con lo descrito por Repetto et al (2001) y Cajarville et al (2006) que obtuvieron concentraciones máximas de N-NH₃ en rumen 4 horas post ingestión, en animales alimentados con praderas que contenían fracciones nitrogenadas rápidamente fermentescibles.

En resumen, los niveles de N-NH₃ son los indicados para una adecuada producción de proteína microbiana y la adición de SRE no promovió una mayor captación de N por parte de los microorganismos ruminales.

Eliminación urinaria de alantoína, producción de proteína y eficiencia de síntesis microbianas

Los niveles de alantoína encontrados en el presente trabajo son similares a los de Pérez et al. (1997), quienes obtuvieron valores de eliminación urinaria de alantoína dentro de un rango de 6,38 – 10,63 mmol/d en ovinos alimentados con diferentes fuentes proteicas y suplementados con dos niveles (alto y bajo) de cebada. Trevaskis et al (2001) también reportan valores semejantes (5,5 – 9,01 mmol/d) en ovinos recibiendo forraje y suplementados con cebada.

No se encontraron diferencias significativas en la eliminación urinaria de alantoína ni entre tratamientos ni entre ensayos aunque hubo un leve aumento en la eliminación durante el E2 en los tres tratamientos. Se ha postulado que la suplementación energética aumenta la eliminación urinaria de bases púricas, entre ellas la alantoína (Chen et al., 1992; Balcells et al., 1993; Pérez et al., 1997, Tebot et al. 2004), lo cual no pudo ser confirmado en este ensayo. Sin embargo, un resultado semejante al encontrado en este trabajo fue observado por Jetana et al. (2000) quienes no obtuvieron diferencias significativas en la eliminación de alantoína en ovinos recibiendo forraje y suplementados con harina de maíz o pulpa de papel.

La producción diaria de proteína microbiana (g/d), estimada a partir de la eliminación urinaria de alantoína, tampoco tuvo diferencias significativas entre los grupos suplementados y no suplementado, si bien al igual que la eliminación de alantoína, hubo un ligero aumento durante el E2, atribuible a la mejor calidad de la pastura. Los valores obtenidos concuerdan con los de Chen et al (1992) (4,5 –9,1 g/día) con la salvedad de que estos valores fueron estimados a partir de la eliminación total de derivados púricos..

Los valores de eficiencia de síntesis microbiana (ESM) obtenidos en este ensayo se encuentran en concordancia con los reportados por Chen et al (1992) quienes señalan una ESM con valores comprendidos entre 12,8 - 15,8 g N/kg de MODI. Los valores de ESM para diferentes categorías de alimentos que se hallan en la literatura fueron compendiados por el ARC (1984). Estos valores cubren un amplio margen que va de 14 - 49 g N microbiano por kg de MODR. En este trabajo se obtuvieron cifras que se encuentran comprendidas dentro de ese rango (22,5 - 30,0) y que concuerdan con los de Pérez et al., (1997) quienes alcanzaron ESM entre 10,9 – 22,2 g N microbiano por kg de MODR, estimados a partir de la eliminación urinaria de alantoína.

Si bien la eliminación urinaria de alantoína, la producción de proteína microbiana y la ESM observadas en este ensayo se encuentran dentro de los valores previstos, no se ha podido reproducir el incremento de estos

parámetros, a partir de la suplementación energética, como los obtenidos en trabajos anteriores (Tebot et al., 2004). Cuando expresamos la ESM sobre la base de la MODI y/o la MODR la eficiencia de síntesis fue básicamente la misma para todos los tratamientos en ambos ensayos.

En la mayoría de los trabajos llevados a cabo sobre suplementación energética, tanto en ovinos como en bovinos, los niveles de suplementación son diferenciales, incrementándose para cada tratamiento. De la misma forma y en base a los elementos constitutivos de la dieta, la cantidad de MS y MO varían aumentando así la oferta de sustratos fermentescibles a los microorganismos ruminales. En este trabajo se utilizó un solo nivel de suplementación FG y FGM y la cantidad de MODI fue similar tanto para los tratamientos como para los ensayos. Este hecho se vio reflejado en los parámetros ruminales estudiados (pH y N-NH₃) los cuales no sufrieron grandes modificaciones que pudiesen estar promoviendo variaciones en la producción de proteína microbiana. Los valores obtenidos de N-NH₃ no son limitantes para la síntesis de PM, pero suponemos que tanto el gasto energético como de N se desvió hacia el mantenimiento microbiano más que para el crecimiento como lo sugieren Feng et al. (1993).

Otro factor que podría estar influyendo en este resultado es la sincronía y disponibilidad energética. Kolver et al. (1998) basados en los cambios de la concentración de N-NH₃ ruminal sugieren que la sincronización de la liberación de energía de los CHO con el N de la pastura mejoraría la captura ruminal de N, aunque este hecho es transitorio y no produce cambios en el status nitrogenado del animal. Gehman et al (2006) no encontraron mejora de la captura ruminal de N al alimentar vacas lecheras con cebada y melaza dos veces por día una hora antes del pastoreo. Henning et al. (1993) sostienen que la disponibilidad constante de E es más importante para el crecimiento microbiano que la sincronización de la fermentescibilidad energía - N, siempre y cuando el N no sea un factor limitante.

Si la disponibilidad de energía y de sustratos fermentables, así como la sincronía energía - N son factores determinantes en la producción de síntesis microbiana, no encontramos una explicación satisfactoria para nuestros resultados, ya que en este trabajo el suplemento energético se distribuía dos veces al día junto a la pastura intercalando dos comidas de solo forraje.

Hoover (1986) sugirió que la ESM se optimiza cuando el contenido de carbohidratos no fibrosos (CHONF) de la dieta está por encima del 37%. Sin embargo Feng et al. (1993) encontraron que un aumento del 29 al 39% de CHNF en la dieta produjo una disminución en la ESM.

En nuestro trabajo, los valores de CHONF para los grupos suplementados se sitúa entre el 29 y 35% lo que podría explicar, en parte, por qué la suplementación energética no resultó en una mayor síntesis de PM. Otro aspecto a considerar serían las diferencias existentes entre aquellos compuestos incluidos dentro del término CHONF, debido a las grandes variaciones entre las proporciones de sacarosa, almidones y pectinas de los alimentos, lo que indicaría que un aumento de CHONF de la dieta no necesariamente se traduce en una mejor ESM (Stern et al., 1994).

En resumen, la suplementación energética no aportó mejoras manifiestas ni en la producción de proteína microbiana ni en la ESM. Si bien

ambos parámetros mostraron valores más altos durante E2 para todos los grupos experimentales, los incrementos no fueron significativos. Esta tendencia podría deberse a un aumento en el N de la dieta base (forraje en estado vegetativo temprano) que no fue la limitante para la producción de proteína microbiana, pero suponemos que la energía aportada por la suplementación energética fue redirigida hacia el mantenimiento de la población microbiana más que a la reproducción de los microorganismos.

Uremia y contribución renal para su mantenimiento

La urea plasmática es un indicador sensible del nivel de ingesta de N y su sincronismo con la liberación de energía en el rumen (Sinclair et al. 2000). Obara et al (1991) y Bargo et al. (2002) indican que la suplementación con concentrados energéticos mejora la eficiencia de utilización del N de los forrajes por parte de los microorganismos ruminales disminuyendo la concentración plasmática de urea. Noro et al (2006) describen una disminución de la uremia en vacas alimentadas con pradera a la que se le adicionó suplementos amiláceos y fibrosos.

En el presente ensayo se encontró una uremia elevada durante el E1 en el grupo suplementado con grano mientras que los restantes grupos (F y FGM) presentan valores dentro de los rangos normales. Este incremento explicaría también la elevada CFu. Este resultado es contradictorio al reportado en la literatura y al obtenido en un trabajo anterior (Tebot et al., 2004) donde hubo una reducción de la uremia en ovinos alimentados con pellets de alfalfa y suplementados con maíz. Para este grupo, no se establecieron los mecanismos de ahorro de urea a nivel renal descritos en ensayos anteriores como la disminución de FFG (Tebot et al., 2002) o una mayor reabsorción tubular de urea (Tebot et al., 2004). Por lo tanto, suponemos que en este grupo se podría haber sobrepasado la capacidad de utilización del N-NH₃ por parte de los microorganismos ruminales, siendo éste absorbido y transformado en urea en el hígado, aumentando la concentración plasmática de urea como lo proponen Noro & Wittwer (2003).

Cuando enfrentamos cada tratamiento con sí mismo en ambos ensayos, los tres grupos presentan una tendencia al incremento en FFG, clearance y carga filtrada de urea durante E2 lo cual podría relacionarse a la mayor carga nitrogenada de la pastura.

En resumen, no encontramos reducciones de la uremia atribuibles a la suplementación energética. No se pone de manifiesto ningún mecanismo de acción renal que contribuya a disminuir la pérdida urinaria de urea y de esa forma aumentar su pool sanguíneo para su reciclaje hacia el rumen.

CONCLUSIÓN

La suplementación energética no afectó negativamente la fermentación ruminal, mejorando la DMS y DMO en ambos ensayos, sobre todo cuando se hizo a base de grano. Sin embargo, la adición de los suplementos no promovió una mayor captación de N por parte de los microorganismos ruminales. Si bien los niveles alcanzados de N-NH₃ son los indicados para una adecuada producción de proteína microbiana, la suplementación energética no mejoró significativamente la misma ni la eficiencia de síntesis, siendo la energía aportada probablemente redirigida hacia el mantenimiento de la población microbiana más que a la reproducción de los microorganismos.

Los niveles y el tipo de suplementación empleados en este trabajo no provocaron desórdenes sobre la fermentación ruminal pero el mayor aporte energético tampoco mejoró la utilización digestiva del nitrógeno de la dieta, por lo que concluimos que, en nuestras condiciones experimentales, la suplementación energética del forraje fresco no aportó los beneficios esperados.

BIBLIOGRAFÍA

1. Abarca S., Ibrahim M., Mannelje L't., Franco M. (1999) Parámetros de fermentación ruminal de animales en pasturas mezcladas gramínea leguminosa para el trópico húmedo de Costa Rica. Rev Fac. Agron (LUZ); 16: 548-552.
2. Amin M.R., Onodera R. (1997). Synthesis of phenylalanine and production of other related compounds from phenylpyruvic acid and phenylacetic acid by ruminal bacteria, protozoa, and their mixture in vitro. J.Gen. Appl.Microl. 43:9-15.
3. Anisson E.F., Bryden W.L. (1999). Perspectives on ruminant nutrition and metabolism.II. Metabolism in ruminant tissues. Nutr.Res. Vet.12:147-177.
4. A.O.A.C. (Association of Official Agricultural Chemistry). 1984. Official Methods of analysis. 14 th. Ed. Arlington, U.S., 1141p.
5. A.R.C.(Agricultural Research Council) (1984) The nutrient requirements of ruminant livestock, Common-wealth Agricultural Bureaux, Slough, England, 45 pp.
6. Archimède H., Sauvant D., Schmidely P. (1997) Quantitative review of ruminal and total tract digestion of mixed diet organic matter and carbohydrate. Rep.Nutr. Develop.37:173-189.
7. Atasoglu C., Newbold C. J., Wallace R. J. (2001). Incorporation of [15N]ammonia by cellulolytic ruminal bacterial Fibrobacter succinogenes BL2, Ruminococcus albus SY3, and Ruminococcus flavefaciens 17. Appl. Environ. Microbiol. 67:2819-2822.
8. Atasoglu C., Guliye A. Y, Wallace R. J.. (2004) Use of stable isotopes to measure de novo synthesis and turnover of amino acid-C and 15N in mixed micro-organisms from the sheep rumen in vitro. Br. J. Nutr. 91:235-261
9. Bach A. (2005) Nitrogen metabolism in the rumen. J. Dairy Sci 88:E9-E21.
10. Bach A., Yoon I.K., Stern M.D. Jung H.G, Chester-Jones H. (1999). Effects of type of carbohydrate supplementation to lush pasture on microbial fermentation in continuous culture. J. Dairy Sci. 82:153-160.
11. Balcells J., Fondevila M., Guada J.A., Castrillo, Surra J.C.E. (1993) Urinary excretions of purine derivatives and nitrogen in sheep given

straw supplemented with different sources of carbohydrates. *Anim. Prod.*57: 287-292.

12. Bargo F., Muller L.D., Delahoy J.E., Cassidy T.W. (2002) Milk response to concentrate supplementation of high producing dairy cows grazing at two pasture allowances. *J Dairy Sci* 85, 1777-92.
13. Bargo F., Muller L.D., Kolver J.E., Delahoy, J.E. (2003) Review: production and digestión of supplemented dairy cows on pasture. *J.Dairy Sci.* 86:1-42.
14. Beever D.E. (1993) Rumen function. En: Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism. Forbes J.M., France J. (1993) Ed. CAB Int. Univ. Press Cambridge, U.K.
15. Beever, D.E. & Siddons, R.C. (1986). Digestion and metabolism in the grazing ruminant. En: Control of Digestion and Metabolism in Ruminants, Proceedings of an International Symposium held in Banff, Canada, 10–14th September, 1984, pp. 479–497 [L.P.Milligan, W.L. Grovum and A. Dobson, editors]. Englewood Cliffs, New Jersey: Prentice Hall.
16. Berzaghi P., Herbein J.H., Polan C.E. (1996). Intake, site and extent of nutrient digestion of lactating cow grazing pasture. *J. Dairy Sci.* 79:1581-1589.
17. Boniface A., Murray R., Hogan J. (1986). Optimum level of ammonia in the rumen liquor of cattle fed tropical pasture hay. *Proc. Aust. Soc. Anim. Prod.* 16: 151-154
18. Bowman J.P., D.W. Sanson (1996) Starch- or fiber- based supplements for grazing ruminants. En: Judkins M.B., McCollum F.T, (Ed.) Proceedings 3rd Grazing Livestock Nutrition Conference. *Proc. West Sect. Am. Soc. Anim. Sci.* 47(Suppl.1):118.
19. Brock F.M., Forsberg C.W., Buchanan Smith, J.G. (1982). Proteolytic activity of rumen microorganisms and effects of proteinase inhibitors. *Appl. Environ. Microbiol.* 44:564-569.
20. Broudiscou L., Jouany J.P. (1995) Reassessing the manipulation of protein synthesis by rumen microbes. *Reprod.Nutr.Develop.*35:517-535.
21. Broderick G A, Radloff W J (2004). Effect of Molasses Supplementation on the Production of Lactating Dairy Cows Fed Diets Based on Alfalfa and Corn Silage. *J. Dairy Sci.* 87:2997-3009.
22. Brown, WF. (1990) Ammoniation or cane molasses supplementation of tropical grass hay. *J. Prod. Agr.*3:377-391.

23. Bryant M. P., (1973) Nutritional requirements of the predominant rumen cellulolytic bacteria. *Fed Proc*; 32:1809-1813.
24. Carro D. M., Miller E. L.. (1999). Effect of supplementing a fibre basal diet with different nitrogen forms on ruminal fermentation and microbial growth in an in vitro semi-continuous culture system (RUSITEC). *Br. J. Nutr.* 82:149-157.
25. Cirio A., Meot F., Delignette-Muller M. L., Boivin R. (2000) Determination of parotid urea secretion in sheep by means of ultrasonic flow probes and a multifactorial regression analysis. *J Anim Sci* 78: 471-476
26. Cajarville C., Curbelo A., Errandonea N., Alonso M., Aguerre M., Repetto J.L. (2000). Efectos de la suplementación con diferentes granos sobre el ambiente ruminal de bovinos a pastoreo. I: pH ruminal cinética de degradación de distintos forrajes. En: XXI Congreso Mundial de Buiatría, Punta del Este, p 146.
27. Cajarville C., Pérez A., Aguerre M., Britos A., Repetto J.L. (2006) Effect of the timing of cut on ruminal environment of lambs consuming temperate pastures. *J. Anim. Sci.* (84), Suppl. 1/*J. Dairy Sci.* (89), Suppl. 1:103.
28. Cameron M.R., Klusmeyer T.H., Lynch G.L., Clark J.H., 1991. Effects of urea and starch on rumen fermentation, nutrient passage to the duodenum, and performance of cows. *J. Dairy Sci*; 74: 1321.
29. Calsamiglia S., Stern M.D., Firkins J.L. (1995) Effects of protein source on nitrogen metabolism in continuous culture and intestinal digestion in vitro. *J. Anim.Sci.*73:1819-1827.
30. Calsamiglia S., Bach A., Ferret A. (2004) Tablas FEDNA de composición y valor nutritivo de forrajes y subproductos fibrosos húmedos. II. SUBPRODUCTOS HUMEDOS. Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal. Madrid, España. 28 pp.
31. Calsamiglia S., Ferret A., Devant M., (2002). Effect of pH and pH fluctuations on microbial fermentation and nutrient flow from a dual-flow continuous culture system. *J. Dairy Sci*; 85: 574-579.
32. Calsamiglia S, Castillejos M., Busquet M. (2005) Estrategias nutricionales para modificar la fermentación ruminal en vacunos lecheros. XXI Curso Actualización FEDNA, Madrid (2005).
33. Cardozo P., Calsamiglia S., Ferret A.. (2000). Effect of pH on microbial fermentation and nutrient flow in a dual flow continuous culture system. *J. Dairy Sci.* 83 (Suppl. 1):265.

34. Cardozo P., Calsamiglia S., Ferret A. (2002). Effects of pH on nutrient digestion and microbial fermentation in a dual flow continuous culture system fed a high concentrate diet. *J. Dairy Sci.* 85 (Suppl. 1):182.
35. Caton J.S., Dhuyvetter D.V., (1997) Influence of energy supplementation on grazing ruminants: requirements and responses. *J. Anim. Sci.* 75:533-542.
36. Chamberlain D.G., Thomas P.C., Wilson W., Newbold C.J., Mac Donald J.C.(1985). The effects on carbohydrate supplements on ruminal concentrations of ammonia in animal given diets on grass silage. *J. Agric. Sci. (Camb)* 104: 331-340.
37. Chamberlain D G, Robertson s and Choung J J. (1993). Sugar versus starch as supplements to grass silage: Effects of ruminal fermentation and the supply of microbial protein to the small intestine, estimated from the urinary excretion of purine derivatives, in sheep. *J. Sci. Food Agric.* 63:189-194.
38. Chen X.B., Abdulrazak S.A., Shand W.J., Oskorv E.R. (1992) The effect of supplementing straw with barley or unmolassed sugar-beet pulp on microbial protein supply in sheep estimated from urinary purine derivative excretion. *Anim Prod.* 55:413-417.
39. Cheng K.J., Costerton J.W. (1980) Adherent rumen bacteria: their role in the digestion of plant material, urea and epithelial cells. En: Ruckebusch Y., Thivend P. (1980) Digestive physiology and metabolism in ruminant. MTP Press, Lancaster pp 227-250.
40. Cheng K. J., Forsberg C.W., Minota H., Costerton J.W. (1991) Microbial ecology and physiology of feed degradation within the rumen. En: Sasak, Y., Kawashima R. (1991) Physiological Aspects of Digestion and Metabolism in Ruminants. Ed Tsuda, T Academic Press, Toronto, ON. pp. 595-624.
41. Chessson A., Forsberg, C.W. (1988). Polysaccharide degradation by rumen microorganisms. En: Hobson, P.N. (1988) The Rumen Microbial Ecosystem., Ed. Elsevier, NY. pp 251-284
42. Clark J. H., Klusmeyer T. H., Cameron M. R. (1992) Microbial Protein Synthesis and Flows of Nitrogen Fractions to the Duodenum of Dairy Cows. *J Dairy Sci* 75: 2304-2323.
43. Cochran, B. (1998) Supplemental protein sources for grazing cattle. Proc. Florida Ruminant Nutrition Symposium. University of Florida, Gainesville, FL. pp 123-137
44. Corbett J.L., Pickering F.S. (1983). Rumen microbial degradation and synthesis of protein in grazing sheep. En: Robards, G.E., Packham,

R.G. (eds). Feed information and Animal Production. C.A.B. Wallingford, U.K. pp. 301-302.

45. Cruz Soto R., Muhammed S. A., Newbold C. J., Stewart C. S., Wallace R. J. (1994). Influence of peptides, amino acids and urea on microbial activity in the rumen of sheep receiving grass hay on the growth of rumen bacteria in vitro. *Anim. Feed Sci. Technol.* 49:151-161.
46. Cullen A.J., Harmon D.L., Nagaraja T.G. (1986) In vitro fermentation of sugar, grains and by products feeds in relation to initiation of ruminal lactate production. *J. Dairy Sci* 69:2616-2621.
47. de Blass C., Rebollar P.G. y Méndez J., (1995). Utilización de Cereales en Dietas de Vacuno Lechero. En: XI Curso de Especialización FEDNA, Barcelona, pp 48-67
48. Demeyer D (1991) Quantitative aspects of microbial metabolism in the rumen and hindgut. En: Rumen microbial metabolism and ruminant digestion. Ed. Jouany J.P., INRA edition Paris. pp 217-237
49. Demeyer, D., Van Nevel C.J. (1986) Influence of substrate and microbial interaction on efficiency of rumen microbial growth. *Reprod.Nutr. Dev* 26:161-179.
50. De Nervi F., (1976) Disorders of the gastrointestinal tract. Grune G., Stratton D., New York, pp 35-37.
51. Denton, D.A. (1957) A gregarious factor in the natural conditioned salivary reflexes of sheep. *Nature* 179:341-344.
52. Dewhurst R.J., Davis D.R., Merry R.J., (2000) Microbial protein supply from the rumen. *Anim. Feed Sci. Technol* 85: 1-21.
53. Dijkstra J., France J., Davies D. (1998) Different mathematical approaches to estimating microbial protein supply in ruminants. *J Dairy Sci* 81: 3370 – 3384
54. Elias A., (1983) Digestión de pastos y forrajes tropicales. (Digestion of tropical pastures and forages) En: Los Pastos en Cuba. Instituto de Ciencia Animal. Cuba, pp 187-247.
55. Elizalde J.C.(2003). Suplementación en condiciones de pastoreo. En:1ª Jornada de Actualización Ganadera, Balcarce, Facultad de Ciencias Agrarias, Balcarce, UNMdP
56. Elizalde J. C. , Merchen N. R., Faulkner D. B (1999a). In Situ Dry Matter and Crude Protein Degradation of Fresh Forages During the Spring Growth *J Dairy Sci* 82: 1978-1990

57. Elizalde J. C. , Merchen N. R., Faulkner D. B . (1999b). Supplemental cracked corn for steers fed fresh alfalfa: I. Effects on digestion of organic matter, fiber, and starch. *J. Anim.Sci.* 77:457-466.
58. Elizalde J. C. , Merchen N. R., Faulkner D. B (1999c). Supplemental cracked corn for steers fed fresh alfalfa: II. Protein and amino acid digestion. *J. Anim.Sci.* 77:467-475.
59. Elizalde J.C., Santini F.J.(1992) Factores nutricionales que limitan las ganancias de peso en bovinos durante el período otoño-invierno. *EEA Balcarce Boletín Técnico* 104, pp 27.
60. Elizalde J.C., Santini F.J., Pasinato A.M. (1996) The effect of stage of harvest on the process of digestion in cattle fed winter oats indoors II. Nitrogen digestion and microbial protein synthesis. *Anim. Feed. Sci. Technol.* 64:245-255.
61. Erasmus L.J., Botha P.M., Cruywagen C.W. (1994) Aminoacid profile and intestinal digestibility in dairy cows of rumen-undegradable protein from various feedstuffs. *J. Dairy Sci.*77:541-551.
62. Feng P., Hoover W.H., Miller T.K., Blauwiel R. (1993) Interactions of fiber nonstructural carbohydrates on lactation and ruminal function. *J. Dairy Sci.* 80: 1426.
63. Firkins J. (1996) Maximizing microbial protein synthesis in the rumen. En: *Altering Ruminant Nitrogen Metabolism to Improve Protein Utilization 36th Annual Ruminant Nutrition Conference (1995)* pp1347S-1354S
64. Fondevilla M., Dehority B.A. (1994) Degradation and utilization of forage hemicelulose by rumen bacteria, single, in co-culture or added sequentially. *J. Appl. Bacteriol.*77: 541-548.
65. Forsberg C. W., Lam, K (1977). Use of adenosine triphosphate as an indicator of the microbial biomass in rumen contents. *Appl. Environ. Microbiol.* 33:528-537.
66. France J., Siddons R.C. (1993) Volatile fatty acid production. En: *Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism.* (1993) Forbes J.M., France J. Editores, Wallingford, CAB International, p 107-121
67. French N., Kennelly J.J. (1990) Effects of feeding frequency on ruminal parameters, plasma insulin, milk yield and milk composition in Holstein cows. *J. Dairy Sci.*73:1857-1863.
68. Fujihara, T., Orskov, E.R., Reeds, P.J., Kyle, D.J., (1987). The effect of protein infusion on urinary excretion of purine derivatives in ruminants nourished by intragastric nutrition. *J. Agric. Sci. (Camb)* 109:7-12

69. Galyean M.L., Goestch A.L., (1993) Utilization of forage fiber by ruminants. En:Jung H.G, Buxton D.R., Hatfield R.D., Ralph J. (Ed) Forage Cell Wall Structure and Digestibility. ASA-CSSA-SSSA, Madison, Winsconsin, pp 34-72.
70. Gehman, A.M., Bertrand J.A., Jenkins T.C., pinkerton B.W. (2006). The effect of carbohydrate source on nitrogen capture in dairy cows on pasture. *J. Dairy Sci.* 89:2659-2667.
71. Goering H.K., Van Soest P.J.(1970) Forage fiber analysis (apparatus, reagents, procedures and some applications). U. S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Agriculture Handbook N° 379, p 20
72. Grant, R.J., Mertens, D.R. (1992) Influence of buffer pH and raw corn starch addition on in vitro fiber digestion kinetics. *J.Dairy Sci.*75:2762-2768.
73. Griswold K. E., Apgar G. A. , Bouton J. ,Firkins J. L. (2003) Effects of urea infusion and ruminal degradable protein concentration on microbial growth, digestibility, and fermentation in continuous culture. *J. Anim. Sci.* 81:329-336
74. Grummer, R.R. (1988) Influence of prilled fat and calcium salts of palm oil fatty acids on ruminal fermentation and nutrient digestibility. *J. Dairy Sci.* 71:117-123
75. Hall M.B. (2002). Working with sugars (and molasses). En: Proceedings 13th Annual Florida Ruminant Nutrition Symposium, Gainesville, Florida pp 146 -158
76. Henning P. H, Lynden Y., Mattheyse M.E., Nauhaus W.K., Schartz H.M., Gilchrist F.M.C. (1980) Factors affecting the intake and digestion of roughage of sheep fed maize straw supplemented with maize grain. *J. Agr. Sci*94:565-573.
77. Henning, P. H., D. G. Steyn, and H. H. Meissner. (1991) The effect of energy and nitrogen supply pattern on rumen bacterial growth in vitro. *Anim. Prod.* 53:165-175.
78. Henning P.H., Steyn D.G., Meissner H.H. (1993) Effect of synchronization of energy and nitrogen supply on ruminal characteristics and microbial growth.*J. Anim. Sci*; 71:2516-2528.
79. Herrera-Saldana R., Gómez-Alarcon R., Torabi M., Huber J.T. (1990) Influence of synchronizing protein and starch degradation in the rumen on nutrient utilization and microbial protein synthesis. *J. Dairy Sci*; 73: 142.

80. Ho Y.W., Abdullah N., Jalaludin S. (1988) Penetrating structures of anaerobic rumen fungi in cattle and swamp buffalo. *J Gen Microbiol.* 134:177-181.
81. Hoover W.H., Kincaid C.R., Varga G.A., Thayne W.V., Junkins L.L. (1984) Effects of solids and liquid flows on fermentation in continuous cultures. IV. pH and dilution rate. *J. Anim. Sci.* 58: 692-699.
82. Hoover W.H., Stokes S.R., (1991) Balancing carbohydrates and proteins for optimum rumen microbial yield. *J. Dairy Sci*; 74: 3630-3644.
83. Hungate R.E. (1966). *The rumen and its microbes.* Academic Press, Inc., New York. 533 p.
84. Hungate R.E. (1979) Evolution of a microbial ecologist. *Ann Rev. Microb.*, 33:1-20.
85. Huntington G.B., 1997. Starch utilization by ruminants: from basics to the bunk. *J. Anim. Sci.* 75: 852-867.
86. Hvelplund T., Madsen J. (1985). Amino acid passage to the small intestine in dairy cows compared with estimates of microbial protein and undegraded dietary protein from analysis on the feed. *Acta Agric. Scand. Suppl.* 25:21-36.
87. Jetana T., Abdullah N., Halim R.A., Jalaludin S., Ho Y.W. (2000) Effects of energy and protein supplementation on microbial-N synthesis and allantoin excretion in sheep fed guinea grass. *Anim, Feed. Sci. Technol.* 84:167-181.
88. Jones, A. L., A. L. Goetsch, S. R. Stokes, and M. Colberg (1988) Intake and digestion in cattle fed warm- or cool-season grass hay with or without supplemental grain. *J. Anim. Sci.* 66:194-203.
89. Jung H.G., Allen M.S., (1995). Characteristics of plant cell wall affecting intake and digestibility of forages by ruminants. *J. Anim. Sci*; 73: 2774-2790
90. Kaufmann W., Hagemeister H, Dirksen G., (1980) Adaptation to changes in dietary composition, level and frequency of feeding. En: *Digestive Physiology and Metabolism in Ruminants*, Ruckebusch Y. and Thivend P., eds. AVI Publishing Co., Westport, CT. p. 587
91. Kernick, B. L. (1991). The effect of form of nitrogen on the efficiency of protein synthesis by rumen bacteria in continuous culture. Ph.D. Thesis, University of Natal, Pietermaritzburg, South Africa.

92. Klusmeyer T. H. , Lynch G. L. , Clark J. H., Nelson D. R. (1991) Effects of Calcium Salts of Fatty Acids and Proportion of Forage in Diet on Ruminal Fermentation and Nutrient Flow to Duodenum of Cows J. Dairy Sci.74:2220-2232
93. Kim K.H., Lee S.S., Kim K.J. (2005) Effect of intraruminal sucrose infusion on volatile fatty acid production and microbial protein synthesis in sheep. Asian-Australasian. J.Anim.Sci; 18: 350-353.
94. Kolver E., Muller L.D., Varga G.A., Cassidy T.J., 1998. Synchronization of ruminal degradation of supplemental carbohydrate with pasture nitrogen in lactating dairy cows. J. Dairy Sci; 81: 2017-2028.
95. Kopečný J., Wallace R. J. (1982). Cellular location and some properties of proteolytic enzymes of rumen bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 43:1026-1033
96. Lana R. P., Russell J. B., Van Amburgh M. E. (1998). The role of pH in regulating ruminal methane and ammonia production. J. Anim. Sci. 76:2190-2196
97. Leaver, J.D. (1985). Milk production from grazed temperate grassland. A review, J. Dairy Res. 52: 313-344
98. Leek, B.F. (1999) Digestión en el estómago de los rumiantes. En: Fisiología de los animales domésticos de Dukes. Swenson M.J., Reece W.O. (Ed). Uteha 2a. ed. pp 387-416.
99. Leng, R.A. (1982) Modification of rumen fermentation. Nutritional limits to animal production from pastures. Proc. of the International Symposium. Commonwealth Agricultural Bureaux, UK.
100. Maeng W. J., Baldwin R. L. (1976). Dynamics of fermentation of a purified diet and microbial growth in the rumen. J. Dairy Sci. 59:636-642.
101. Marshall S.A., Campbell C.P., Mandell I.B., Wilton J.W. (1992) Effects of source and level of dietary neutral detergent fiber on feed intake, ruminal fermentation, ruminal digestion in situ, and total tract digestion in beef cattle fed pelleted concentrates with or without supplemental roughage. J Anim Sci. 70: 884-893.
102. Matejovsky K.M., Sanson D.W. (1995) Intake and digestion of low, medium and high quality grass hay by lambs receiving increasing levels of corn supplementation. J.Anim.Sci.73:2156-2163.
103. Mathers J.C., Miller E.L. (1981) Quantitative studies of food protein degradation and the energetic efficiency of microbial protein synthesis in the rumen of sheep, given chopped Lucerne and rolled barley. Br. J. Nutr. 25: 351-366.

104. Matras J., Bartle S. J. , Preston R. L. (1991). Nitrogen utilization in growing lambs: Effects of grain (starch) and protein sources with various rates of ruminal degradation. *J. Anim. Sci.* 69:339-347.
105. Mc Allister T.A., Phillippe R.C, Rode L.M., Cheng K.J. (1993) Effect of the protein matrix on the digestion of cereal grains by ruminant microorganisms *J. Anim. Sci* 71:205-212.
106. McLeod G.K., Colucci J.P., Moore A.D., Grieve D.G., Lewis N. (1994) The effects of feeding frequency of concentrate and feeding sequence of hay on eating behaviour, ruminal environment and milk production in dairy cows *Can. J. Anim. Sci.* 74:103-113.
107. Minato H., Endo A., Higuchi M., Ootomo Y., Vermura, T. (1966) Ecological treatise on the rumen fermentation. I. The fractionation of bacteria attached to the rumen digesta solids. *J gen. Microbiol.* 22:259-276.
108. Minson, D .J. (1981). Effects of chemical and physical composition of herbage eaten upon intake. En: *Nutritional limits to animal production from pastures. Proceedings of an International Symposium held at Sta. Lucia.* Ed. J.R. Hacker, Queensland, Australia. pp. 187-197.
109. Newbold J. R., Rust S. R. (1992). Effect of asynchronous nitrogen and energy supply on growth of ruminal bacteria in batch culture. *J. Anim. Sci.* 70:538-546
110. Nocek J.E., Russell J.B. (1988) Protein and energy as an integrated system. Relationship of ruminal protein and carbohydrate availability to microbial synthesis and milk production. *J. Dairy Sci.* 71:2070-2107.
111. Nocek J.E, Tamminga, S.(1991) Site of digestion of starch in the gastrointestinal tract of dairy cows and its effects on milk yield and composition. *J. Dairy Sci.* 74: 3598-3629.
112. Noro M., Wittwer F. (2003) Utilidad de la determinación de urea en la leche. *Vetermas* 2:2-5.
113. Noro M., Vargas V., Pulido R.G., Wittwer F. (2006) Efecto del tipo de concentrado sobre indicadores sanguíneos del metabolismo de energía y de proteína en vacas lecheras en pastoreo primaveral. *Arch. Med. Vet.* 38:227-232.
114. Nozière P., Michalet-Doreau B. (1997) Effects of amount and availability of starch on amylolytic activity of ruminal solid-associated microorganisms. *J. Sci. Food Agric.* 73:417-476.
115. NRC. 1985. *Nutrient Requirements of Sheep.* 6th Ed. National Academy Press, Washington

116. NRC. 2001. Nutrient Requirements of Dairy Cattle. 7th rev. ed. Natl. Acad. Sci., Washington, DC
117. Obara Y., Dellow D.W., Nolan J.V. (1991) The influence of energy-rich supplements on nitrogen kinetics in ruminants. En: Tsuda T., Sasaki Y., Kawashima R. (Ed) Physiological aspects of digestion and metabolism in ruminants. Proceedings of 7th International Symposium on Ruminant Physiology, pp 515-539.
118. Obara, Y., Shimbayashi K. (1980) The appearance of re-cycled urea in the digestive tract of goats during the final third of a once daily feeding of a low-protein ration. Br. J. Nutr. 44:295–305
119. Obispo N.E., Pares P., Hidalgo C., Palma J., Godoy S., (2001) Consumo de forraje y ganancia diaria de peso en bovinos de carne en crecimiento suplementados con fuentes proteicas. Zootecnia Trop. 19: 423-442.
120. Ørskov E.R. (1992) Protein nutrition in ruminants. Academic Press Limited.24-28 Oval Road, London NW1 7DX, UK.
121. Ørskov E.R., Fraser C. (1975) The effects of processing of barley-based supplements on rumen pH, rate of digestión and voluntary intake of dried grass in sheep. Br. J. Nutr. 34:493-500.
122. Ørskov E.R, Mc Donald J. (1979) The estimation of protein degradability in the rumen adjusted rate of passage. J. Agric. Sci. 92:499-503.
123. Owens F.N., Goetsch, A.L. (1988) Fermentación Ruminal. En: C.D. Church. El Rumiante: Fisiología digestiva y nutrición. Zaragoza, Ed. Acibia S.A., pp 159-189.
124. Pérez A. (2006) pH, Amoníaco y Producción de Proteína microbiana en el rumen de corderos, según el horario de corte de la pastura consumida. Tesis de grado. Facultad de veterinaria, UdelaR, Montevideo ,Uruguay.
125. Pérez J.F., Balcells J., Guada J.A., Castrillo C., (1997) Rumen microbial production estimated either from urinary purine derivative excretion or from direct measurements of 15N and purine bases as microbial markers: effect of protein source and rumen bacteria isolates. J. Anim. Sci., 65: 225-236.
126. Philippeau C., Martin C., Michalet-Doreau B. (1999) Influence of grain source on ruminal characteristics and rate, site and extent of digestion in beef steers. J. Anim. Sci., 77:1587-1596.

127. Phillips, M. W., Gordon G. L. R. (1995) Composition chimique des protozoaires et des bactéries libres du rumen de vaches . Anim. Res. 44 Suppl. 1: 141.
128. Poppi D.P., McLennan S.R. (1995) Protein and energy utilization by ruminants at pasture. J.Anim.Sci. 73:278-290.
129. Preston T., Leng R. (1990) Ajustando los sistemas de producción pecuaria a los recursos disponibles. Aspectos básicos y aplicados del nuevo enfoque sobre la nutrición de rumiantes en el trópico. Condit. Colombia, 312 p.
130. Puchala, R. Kulasek, G.W. (1992) Estimation of microbial protein flow from the rumen of sheep using microbial nucleic acid and urinary excretion of purine derivatives. Can. J. Anim. Sci., 72:821-830
131. Pulido R.G., Balocchi, O., Fernandez, J. (2001) Efecto del nivel de producción de leche sobre el comportamiento ingestivo en vacas lecheras en pastoreo invernal. Arch.Med. Vet 33,137-144
132. Rearte D.H., Santini F.J. (1989) Digestión ruminal y producción en animales a pastoreo. Rev Arg Prod Anim; 9: 93-105.
133. Rémond D., Chaise J.P., Delval E., Poncet C (1993) Net transfer of urea and ammonia across the ruminal wall of sheep. J. Anim Sci 71:2785-2792.
134. Renner J.E, Baschar H.O., Montesinos Ramos I.G. (1991). Tratamiento de la Acidosis Aguda del Contenido Ruminal Mediante una Solución de Hidroxido de Calcio. En: XIX Jornadas Uruguayas de Buiatría, 19 al 22de junio 1991, Paysandú, Uruguay
135. Repetto J.L., Aguerre M., Alonso M., Curbelo A., Errandonea N., CajarvilleC., (2001) Concentración de amoniaco ruminal en vacas en pastoreo suplementadas con diferentes granos. En: VII Congreso Nacional de Veterinaria, 19 al 22 de noviembre 2001, Montevideo, Uruguay
136. Repetto J.L., Britos A., Cozzolino D., Errandonea N., Cajarville C. (2003a) Nutritive value of lucern and fescue during autumn: relationship between water soluble carbohydrates and nitrogen content throughout the day. Proceedings of IX World Conference on Animal Production, Porto Alegre, Brasil, p 26.
137. Repetto J.L., Errandonea N., Britos A., Cozzolino D., Cajarville C. (2003b) Changes in water soluble carbohydrates contents during the day in lucern and fescue cut in autumn.Proceedings of the Bristish Society of Anim. Sci, York, U.K. p176

138. Repetto J.L, Mota M., Marinho P., Vega L., Cajarville C., (2000) pH ruminal y cinéticas de degradación del forraje en bovinos que pastorean praderas suplementadas o no con concentrados energéticos. XVI Reunión Latinoamericana de Producción Animal, 28 al 31 marzo 2000, Montevideo, Uruguay.
139. Reynolds C.K., Harmon D.L., Cecava M.J. (1994) Absorption and delivery of nutrients for milk protein synthesis by portal-drained viscera. *J. Dairy Sci.* 77:2887-2808.
140. Rodriguez M.N., Tebot I., Le Bas A., Nievas C., Leng L., Cirio A. (1996) Renal function and urea handling in pregnant and lactating Corriedale ewes. *Can. J. Anim. Sci.*, 76(3), 469-472.
141. Romagnolo L.C., Polan C.E. Barbeau W.E. (1994) Electrophoretic analysis of ruminal degradability of corn proteins. *J. Dairy Sci.*77:1093-1099.
142. Russell J.B., Sniffen C.J., Van Soest P.J. (1983) Effect of carbohydrate limitation on degradation and utilization of casein by mixed rumen bacteria. *J. Dairy Sci*; 66: 763.
143. Russell J.B., J.D. O'Connor, D.G. Fox, P.J. Van Soest, C.J. Sniffen. (1992). A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: I. Ruminal fermentation. *J.Anim.Sci.* 70:3551-3561.
144. Russell J.B., Wallace R.J. (1988) Energy-yielding and energy-consuming reactions. En: Hobson P.N.(1988) *The rumen microbial Ecosystem*. Ed. Elsevier Applied Science, London pp185-215.
145. Russell J.B., Wilson D.B., (1996). Why are ruminal cellulolytic bacteria unable to digest cellulose at low pH?. *J Dairy Sci*; 79: 1503-1509.
146. Sanson D.W., D.C. Clanton. (1989). Intake and digestibility of low-quality meadow hay by cattle receiving various levels of whole shelled corn. *J. Anim. Sci.* 67:2854.
147. Sanson, D. W. (1993) Effects of increasing levels of corn or beet pulp on utilization of low-quality crested wheatgrass hay by lambs and in vitro dry matter disappearance of forages. *J Anim Sci* 71: 1615-1622
148. Satter L. D., Slyter L.L., (1974) Effect of ammonia concentration on rumen microbial protein production in vitro. *Br. J. Nutr* ; 32 : 199-208.
149. SAS. (1999) *SAS/STAT User's Guide (Release 8.1)*, SAS Inst., Inc., Cary, NC.

150. Sauvant D., Chapoutot P., Archimède H. (1994) La digestion des amidons par les ruminants et ses conséquences. INRA Prod. Anim., 7:115-124.
151. Schauff D. J., Clark J. H (1989) Effects of Prilled Fatty Acids and Calcium Salts of Fatty Acids on Rumen Fermentation, Nutrient Digestibilities, Milk Production, and Milk Composition. J Dairy Sci 72: 917-927
152. Schneider P. , Sklan D. , Chalupa W., Kronfeld D. S. (1988) Feeding Calcium Salts of Fatty Acids to Lactating Cows . J Dairy Sci 71: 2143-2150
153. Siddons R.C., Nolan J.V., Beever D.E., MacRae J.C. (1986) Nitrogen digestion and metabolism in sheep consuming diets containing contrasting forms and levels of N. Br. J.Nutr.54:175-187
154. Silveira C., Oba M., Yang W.Z., Beauchemin K.A. (2007) Selection of barley grain affects ruminal fermentation, starch digestibility, and productivity of lactating dairy cows. J. Dairy Sci. 90:2860-2869.
155. Sinclair K.D., Sinclair L.A., Robinson J.J. (2000) Nitrogen metabolism and fertility in cattle: I. Adaptative changes in intake and metabolism to diets differing in their rate of energy and nitrogen release in the rumen. J Anim Sci 78:2659-2669.
156. Smet A.M., Boever J.L., Brabander D.L., Vanacker J.M. Boucque C.V. (1995). Investigation of dry matter degradation and acidotic effect of some feedstuffs by means of in sacco and in vitro incubations. Anim. Feed Sci. Tech., 51:297-315.
157. Sniffen C.J. O'Connor J., Van Soest P., Fox D. (1992) A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: II. Carbohydrate and protein availability. J. Anim.Sci.70:3562-3577
158. Sniffen C. J., Robinson P. H. (1987). Microbial growth and flows as influenced by dietary manipulations. J. Dairy Sci. 70:425-441
159. Stern M.S., Calsamiglia S., Endres M.I., (1994) Dinámica del metabolismo de los hidratos de carbono y del nitrógeno en el rumen. En: X Curso de Especialización FEDNA, Madrid.pp177-194
160. Stern, M. D., Hoover W. H. (1979). Methods for determining and factors affecting rumen microbial protein synthesis: A review. J. Anim. Sci. 49:1590-1603
161. Stokes S.R., Hoover W.H., Millerand T.K., Manski R.P. (1991) Impact of carbohydrate and protein levels on bacterial metabolism in continuous culture. J. Dairy Sci. 74:860-870.

162. Sutton J.D. Phipps R. H., Cammell S. B Humphries, D. J. (2001) Attempts to improve the utilization of urea-treated whole-crop wheat by lactating dairy cows. *Anim. Sci.* 73:137–147.
163. Staples C.R., Davis C.L., McCoy G.C., Clark J.H., 1984. Feeding value of wet corn gluten feed for lactating dairy cows. *J. Dairy Sci*; 67: 1214-1220.
164. Tamminga S. (1979) Protein degradation in the forestomachs of ruminants. *J. Anim. Sci.*49:1615-1630.
165. Tamminga S. (1993) Influence of feeding management on ruminant fibre digestibility En: Forage cell wall structure and digestibility. Jung H.G., Buxton D.R., Hatfield RD, Ralph J. (Ed) Madison, Wisconsin pp 571-602
166. Tebot I., Faix S., Szanyiova M., Cirio A., Leng L. (1998) Micropuncture study on urea movements in the kidney cortical tubules of low protein fed sheep. *Vet. Res.*, 29:99-105.
167. Tebot I., Britos A., Godeau J.M., Cirio A., (2002) Microbial protein production determined by urinary allantoin and renal urea sparing in normal and low protein fed corriedale sheep. *Vet Res*; 33:101-106.
168. Tebot I., Ibarra A.L., Purtscher F., Cirio A. (2004) Influence of energy supply on microbial protein synthesis and renal handling in Corriedale sheep. *J. Anim. Feed Sci.*, 13:223-226.
169. Theurer C. B.(1986) Grain Processing Effects on Starch Utilization by Ruminants. *J Anim Sci* 63: 1649-1662.
170. Trevaskis L.M., Fulkerson, W.J, Gooden, J.M. (2001) Provision of certain carbohydrate-based supplements to pasture-fed sheep, as well as time of harvesting of the pasture, influences pH, ammonia concentration and microbial protein synthesis in the rumen. *Aust.J Exp. Agr.* 41:21-27
171. Ulyatt M.J., Mc Rae J.C., Clarke R.T. y Pearce P.D., (1975) Quantitative digestion of fresh herbage by sheep. IV. Protein synthesis in the stomach. *J. Agr. Sci., Camb*, 84: 453-458.
172. Van Soest, P. (1982) *Nutritional ecology of the ruminant* O & B Books, Corvallis, Oregon, USA, 374 p.
173. Van Soest P.J., (1994). *Nutritional Ecology of the Ruminant*. 2a ed., Ithaca, Ed. Cornell University Press, 476 p.
174. Van Vuuren A.M., Tamminga S., Ketelaar R.S., (1990). Ruminant availability of nitrogen and carbohydrates from fresh and preserved herbage in dairy cows. *Neth. J. Agric. Sci*; 38: 49-512

175. Van Vuuren A.M., Van der Koelen C.J., Vroons-de Brun J., (1986). Influence of level and composition on concentrate supplements on rumen fermentation patterns of grazing dairy cows. *Neth. J. Agric. Sci*; 34: 457-467.
176. Van Vuuren A.M., Van Der Koelen C.J., Vroons-de Brun J., (1993). Ryegrass versus corn starch or beet pulp fiber diets effects on digestion and intestinal aminoacids in dairy cows. *J. Dairy Sci*; 76: 2692.
177. Velle W., Sjaastad Ø.V., Aulie A., Gronset D., Feigwinter K., Framstad T. (1997) Rumen escape and apparent degradation of amino acids after individual intraruminal administration to cows. *J. Dairy Sci.* 80:3325-3332.
178. Voelker J.A., Allen M.S., (2003) Pelleted beet pulp substituted for high-moisture corn:3. Effects on ruminal fermentation, pH and microbial protein efficiency in lactating dairy cows. *J Dairy Sci*; 86: 3562-3570.
179. Wallace, R.J., (1994). Amino acid and protein synthesis, turnover and breakdown by ruminal microorganisms. En: J.M. Asplund (Ed.) *Principles of Protein Nutrition of Ruminants*, 71-112. CRC Press, Boca Ratón, Florida, USA.
180. Wallace R.J., Cotta M.A. (1988). Metabolism of nitrogen-containing compounds. En: Hobson, P.N (1988) *The Rumen Microbial Ecosystem*, Ed. Elsevier Applied Science. London.
181. Wallace R.J., Onodera R., Cotta M.A.(1997) Metabolism of nitrogen-containing compounds. En: Hobson P.N, Stewart C.S.(1997) *The Rumen Microbial Ecosystem* 2nd ed. Ed Chapman & Hall London, pp 283-328.
182. Yemm E. W., Willis A. J. (1954) The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. *Biochem J.* 57: 508-514.
183. Yokohama, M.T., Johnson, K.A. (1988) *Microbiología del rumen e intestino* En: *El rumiante, fisiología digestiva y nutrición* C.D. Church, Editorial Acribia, Zaragoza, España. p 137-158
184. Wiedmeier R.D., Tanner B.H., Bair J.R., Shenton H.T., Arambel M.J., Walters J.L. (1992). Effect of a new molasse byproduct, on nutrient digestibility and ruminal fermentation in cattle. *J Anim.Sci.*70:1936 - 1940.

