



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY



Facultad de Veterinaria  
Universidad de la República  
Uruguay

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**Programa de Posgrado**

**ESTRATEGIAS DE ALIMENTACIÓN DE OVINOS EN SISTEMAS A BASE DE  
PASTURAS**

**ANALÍA PÉREZ RUCHEL**

**TESIS DE DOCTORADO EN PRODUCCIÓN ANIMAL**

**URUGUAY  
2015**





**Facultad de Veterinaria**  
Universidad de la República  
Uruguay

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**Programa de Posgrado**

**ESTRATEGIAS DE ALIMENTACIÓN DE OVINOS EN SISTEMAS A BASE DE  
PASTURAS**

**ANALÍA PÉREZ RUCHEL**

**Cecilia Cajarville,  
Prof. PhD  
Director de Tesis**

**José Luis Repetto,  
Prof. PhD  
Co-Director de Tesis**

**Gilberto Vilmar Kozloski,  
Prof. PhD  
Co-Director de Tesis**

**2015**

**INTEGRACIÓN DEL TRIBUNAL DE  
DEFENSA DE TESIS**

**2015**

# **ACTA DE DEFENSA DE TESIS**

# **INFORME DEL TRIBUNAL**

## AGRADECIMIENTOS

Antes que nada agradezco a mi Familia, en especial a mis Padres, quienes no solo se esforzaron para que yo pudiera estudiar sino que también siempre confiaron en mí, me impulsaron y motivaron a estudiar y a superarme. Sé que en algún lugar muy cercano mi Padre va a estar muy orgulloso de mí, así como yo de él.

A Martín, por darme un motivo para luchar y vivir cada día y por haberme acompañado y apoyado en los mejores y peores momentos de mi vida.

Además agradezco a todas las personas e instituciones que han colaborado en la realización de este trabajo, en especial:

A mis tutores, Cecilia Cajarville, José Luis Repetto y Gilberto Kozloski, por guiarme y brindarme su apoyo a lo largo de todo este trabajo.

A los integrantes y Amigos del IPAV - Departamentos de Nutrición y Bovinos: Coco (Sebastián Brambillasca), Ale (Alejandro Britos), Nicolle Pomiés, Caro (Carolina Fiol), Martín Aguerre, Alejandro Mendoza, Alvarito (Álvaro Santana) y Germán Antúnez, por su participación en las actividades de campo, y principalmente por bancarme cada día.

A los ahora Doctores Manuel Michelini, Luis Pérez, Germán Soldini, Florencia Sanguinetti, Bruno Oudrí, Daniela Silva, Matías Muniz, Marcos Padilla y Licenciada Carla Bonifacino. Y a los Bres. Carolina Iturria, Wilder Saavedra, Santiago Gonnet, Matías Morales, Germán Gonçalvez, Martín Estramil, Color (Santiago Ultra), Elisabeth Artigas, Pia Arrieche y Jacinta Ubilla, por hacer posible el trabajo de campo y por su ayuda en las actividades de laboratorio.

A los integrantes del Departamento de Zootecnia, de la Universidad Federal de Santa María (Brasil), en especial a Alsiane Capellesso, Flavia Nesi Maria, Gisele Lutz y ao pessoal da Pós: Suka (Suelén Ávila), Mariana Mezzomo y Tiago Orlandi, por hacer posible el trabajo de campo y por su ayuda en las actividades de laboratorio.

A los integrantes del Laboratorio de Microbiología del Instituto de Investigaciones Clemente Estable, Pablo Zunino, Martín Fraga y Karen Perelmuter, por su ayuda en los análisis realizados en su instituto.

A Elena de Torres y al personal del Campo Experimental de Libertad, de la Facultad, por su colaboración en la puesta a punto del diseño experimental y, en especial, a Aurelia e Isabel por su compañía y aguante.

A Codenor S.A, por brindar materiales para la realización del ensayo.

A todos, MUCHAS GRACIAS!

## ÍNDICE

	Página
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	i
<b>RESUMEN</b>	1
<b>SUMMARY</b>	2
<b><u>1. INTRODUCCIÓN</u></b>	4
<b><u>2. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS</u></b>	5
2.1. PRODUCCIÓN OVINA EN URUGUAY	5
2.2. UTILIZACIÓN DE PASTURAS EN SISTEMAS SEMI-INTENSIVOS E INTENSIVOS DE PRODUCCIÓN	7
2.3. ESTRATEGIAS PARA MAXIMIZAR LA UTILIZACIÓN DIGESTIVA DE LAS PASTURAS	8
2.3.1. <i>Manejo del tiempo de acceso a las pasturas</i>	8
2.3.2. <i>Utilización de sustancias buffer como moduladores de la fermentación</i>	10
2.3.3. <i>Combinación de pasturas con otros alimentos</i>	12
<b><u>3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</u></b>	14
<b><u>4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</u></b>	14
4.1 HIPOTESIS	14
4.2 OBJETIVO GENERAL	15
4.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
<b><u>5. ESTRATEGIA DE LA INVESTIGACIÓN</u></b>	15
<b><u>6. MATERIALES Y MÉTODOS</u></b>	17
6.1. EXPERIMENTO I	18
<i>Animales, dietas y diseño experimental</i>	18
6.1.1. <i>Experimento Ia</i>	18
6.1.1.1. Mediciones	18
6.1.1.2. Análisis químicos, determinaciones y cálculos	19
6.1.1.3. Análisis estadístico	21
6.1.2. <i>Experimento Ib</i>	22
6.1.2.1. Mediciones	22
6.1.2.2. Análisis químicos, determinaciones y cálculos	22
6.1.2.3. Análisis estadístico	23
6.2. EXPERIMENTO II	24
<i>Animales, dietas y diseño experimental</i>	24

6.2.1. Experimento IIa	25
6.2.1.1. Mediciones	25
6.2.1.2. Análisis químicos, determinaciones y cálculos	26
6.2.1.3. Análisis estadístico	27
6.2.2. Experimento IIb	28
6.2.2.1. Mediciones	28
6.2.2.2. Análisis químicos y cálculos	28
6.2.2.3. Análisis estadístico	28
6.3. EXPERIMENTO III	29
<i>Animales, dietas y diseño experimental</i>	29
6.3.1. Mediciones y muestreos	30
6.3.2. Análisis químicos de alimentos ofrecidos y rechazados	32
6.3.3. Análisis estadísticos	32
<b>7. <u>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u></b>	33
7.1. EXPERIMENTO Ia	33
7.2. EXPERIMENTO Ib	37
<i>Estudio I</i>	37
<i>Estudio II</i>	38
7.3. EXPERIMENTO IIa	40
7.4. EXPERIMENTO IIb	47
7.5. EXPERIMENTO III	48
<b>8. <u>CONCLUSIONES</u></b>	51
<b>9. <u>IMPLICANCIAS</u></b>	52
<b>10. <u>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u></b>	52
<b>11. <u>ANEXOS</u></b>	66
11.1. ANEXO I – PUBLICACIÓN I	
11.2. ANEXO II – PUBLICACIÓN II	
11.3- ANEXO III – PUBLICACIÓN III	

## RESUMEN

Se estudió el efecto de diferentes estrategias de alimentación vinculadas al manejo, al uso de aditivos y al tipo de dieta sobre el consumo, ambiente ruminal y utilización digestiva de las dietas en ovinos. Se realizaron 3 experimentos con ovinos alojados en jaulas metabólicas individuales. El Experimento I consistió en un diseño simple, con 18 borregos ( $46,9 \pm 6$  kg PV) que consumieron forraje fresco (80% *Lotus corniculatus*) como único alimento, disponible todo el día: **24h**, 6 h/d: **6h (Control)**, o 6h/d + buffer (20 g/kg MS) compuesto por una mezcla de NaHCO<sub>3</sub> y MgO (75:25): **Buffer**. El Experimento II consistió en un diseño simple, con 24 corderos ( $25,2 \pm 3,7$  kg PV) alimentados con ración totalmente mezclada (RTM) ofrecida *ad libitum* durante todo el día: **RTM100**, RTM a nivel de 0,75 y 0,50 del consumo potencial y forraje fresco (principalmente alfalfa) sin restricción: **RTM75** y **RTM50**, respectivamente, o únicamente forraje fresco (79% *Medicago sativa*) *ad libitum* durante todo el día: **RTM0**. El Experimento III consistió en un diseño de cuadrado latino 3x3, con 3 ovinos adultos ( $69,4 \pm 0,4$  kg PV), alimentados solo con RTM: **RTM**, solo con forraje fresco (avena+ryegrass y fardo de Tifton 70:30): **Forraje**, o una dieta mixta: 50% forraje y 50% RTM: **RTM+F**. Todos los resultados fueron analizados mediante el procedimiento mixto del SAS. En el Experimento I, el agregado de buffers aumentó el consumo de agua, principalmente de bebida, lo que aumentó el tránsito digestivo, diluyó el contenido ruminal (con menor concentración de amoníaco y capacidad fermentativa del inóculo) y aumentó el pH ruminal. La restricción en el tiempo de acceso al forraje (6h) no afectó la cantidad total de bacterias ruminales pero sí modificó su perfil, disminuyendo la cantidad de bacterias fibrolíticas y consumidoras de lactato. El número de bacterias totales fue menor a las horas 4 y 8 en relación a la hora 0 desde el inicio de la ingesta. En el Experimento II, la disminución en los niveles de RTM en la dieta aumentó el consumo de forraje y total de todos los nutrientes. Este efecto desencadenó efectos como una ligera disminución en la digestibilidad de la materia orgánica. Además, la disminución en los niveles de RTM aumentó linealmente el volumen de gas generado *in vitro*, pero disminuyó linealmente la tasa de producción de gas. En el Experimento III, la desaparición de la MS *in situ*, incrementó cuando se utilizó la dieta mixta (RTM+F) respecto al uso exclusivo de RTM. El grado de adherencia bacteriana aumentó al incrementar el rol del forraje en la dieta de los animales. La actividad enzimática fibrolítica tendió a ser mayor para RTM+F respecto a la dieta compuesta únicamente por forraje. Se concluye que en los sistemas más intensivos de producción ovina que utilizan forrajes frescos de alta calidad, el empleo de buffers del tipo NaHCO<sub>3</sub>-MgO no se justificaría. Sin embargo, el uso de RTM alternado con períodos de pastoreo representaría una estrategia interesante, mitigando los efectos negativos del uso restringido de la pastura en la microbiota ruminal y favoreciendo el consumo.

**Palabras clave:** forraje fresco, tiempo de acceso al forraje, buffers, consumo, digestibilidad, ambiente ruminal, actividad fibrolítica.

## SUMMARY

The effect of different feeding strategies related to the management, use of additives and type of diet on intake, ruminal environment and digestive use of diets was studied in sheep. Three experiments with sheep housed in individual metabolic cages were performed. The Experiment I consisted of a simple design, with 18 lambs ( $46.9 \pm 6$  kg BW) fed only fresh forage (80% *Lotus corniculatus*) all day long: **24h**, 6 h/d: **6h (Control)**, and 6h/d + buffer (20 g/kg DM) composed by a mixture of NaHCO<sub>3</sub> and MgO (75:25): **Buffer**. The Experiment II consisted of a simple design, with 24 lambs ( $25.2 \pm 3.7$  kg BW) fed total mixed ration (TMR) offered *ad libitum* throughout the day: **TMR100**, TMR at a level of 0.75 and 0.50 of the potential intake and unrestricted offer of fresh forage: **TMR75** and **TMR50**, respectively, and only fresh forage (mainly alfalfa) *ad libitum* throughout the day: **TMR0**. The Experiment III consisted of a latin 3x3 square, with 3 mature male sheep ( $69.4 \pm 0.4$  kg BW) fed only TMR: **TMR**, only forage: **Forage** (oat+rye grass and Tifton hay 70:30), and a mixed diet: forage 50% and TMR 50%: **TMR+F**. All results were analyzed by a mixed procedure of SAS. In the Experiment I, the buffers addition increased water intake, mainly the drinking water, generating an increase in the digestive transit, diluted the rumen content (with lower ammonia concentrations and fermentative capacity of the inoculum) and increased ruminal pH. The restriction in the time of access to forage (6h) did not affect the total number of rumen bacteria but modified its profile, reducing the number of fibrolytic bacteria and lactate consumers. The number of total bacteria was lower at 4 and 8 hours relative to the beginning of the intake -hour 0. In the Experiment II, the decrease in the levels of TMR in the diet of lambs led to a higher forage and total nutrients intake. This effect triggered effects such as a slight decrease in the OM digestibility. Moreover, the decrease in the levels of TMR linearly increased the volume of gas generated *in vitro*, but linearly decreased the rate of gas production. In the Experiment III, *in situ* DM disappearance increased when mixed diet (TMR+F) was used against the exclusively TMR diet. The degree of bacterial adhesion increased as the forage role increased in the diet. The fibrolytic enzymatic activity tended to be higher for TMR+F regarding to the diet composed only by forage. It is concluded that in the most intensive sheep production systems that use fresh high quality forage, the use of buffers as NaHCO<sub>3</sub>-MgO would not be justified. However, the use of TMR alternated with grazing periods would be an interesting strategy, mitigating the negative effects of restricted use of pasture in the ruminal microbiota and promoting the intake.

**Keywords:** fresh forage, time of access to forage, buffers, intake, digestibility, ruminal environment, fibrolytic activity.

Esta Tesis está basada en tres Experimentos referidos en el texto por números romanos (Experimentos I, II y III), que dieron lugar a tres publicaciones:

- I.** Pérez-Ruchel A.; Repetto J.L.; Cajarville C. (2014). Use of NaHCO<sub>3</sub> and MgO as additives for sheep fed only pasture for a restricted period of time per day: effects on intake, digestion and the rumen environment. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, v.:98, p.: 1068-1074, 2014a (ANEXO I).
- II.** Pérez-Ruchel A.; Repetto J.L.; Fraga M.; Perelmuter K.; Zunino P.; Cajarville C. (2014) La restricción en el tiempo de acceso al forraje en ovinos alimentados con pastura de buena calidad afecta algunos grupos microbianos ruminales. *Veterinaria (Montevideo)*, v.: 50 (194), p.: 22-33 (ANEXO II).
- III.** Pérez-Ruchel A.; Repetto J.L.; Cajarville C. (2015). Supplementing high quality fresh forage to growing lambs fed a total mixed ration diet led to higher intake without altering nutrient utilization (ANEXO III).

En la Publicación I, *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, los derechos de autor fueron transferidos a Wiley-Blackwell, que otorgó el permiso correspondiente para su inclusión en la presente Tesis. En la Publicación II, los derechos de autor fueron transferidos a la revista *Veterinaria (SMVU – Uruguay)*, la que otorgó el permiso correspondiente para su inclusión en la presente Tesis. En la Publicación III, *Animal*, los derechos de autor fueron transferidos a la editorial Cambridge, pero por cláusula expresa, los autores retienen derecho para su utilización personal o institucional con fines docentes y de investigación.

## 1. INTRODUCCIÓN

La producción ovina en Uruguay ha estado tradicionalmente orientada a la producción de lana en condiciones fundamentalmente extensivas. Durante la década del 90, disminuyó en forma significativa el stock ovino debido a la disminución internacional del precio de la lana. Sin embargo, la exportación de carne ovina en nuestro país ha aumentado 3 veces en el período 2004/2011 (DIEA, 2012), manteniéndose como el tercer exportador de carne ovina del mundo, detrás de Australia y Nueva Zelanda. A pesar de que, al igual que sus competidores, Uruguay cuenta con una menor producción de carne, la escasez de carne ovina en el mundo y una demanda incrementada está provocando la valorización de la misma. Estas condiciones del mercado han generado, durante los últimos años, una lenta pero progresiva intensificación de la producción ovina en Uruguay. De todas maneras, dado que gran parte de nuestro país posee condiciones muy favorables para la producción de forrajes de alta calidad, la dieta base de los animales continúa siendo esencialmente pastoril.

La utilización de pasturas en sistemas intensivos de producción presenta diversos beneficios. De acuerdo con varios estudios, los sistemas pastoriles disminuyen notoriamente la erosión del suelo respecto a los sistemas de confinamiento (Hanson, 1998; Soder & Rotz, 2001). Asimismo, serían beneficiosos para la salud de los animales respecto a sistemas de confinamiento, y se considera que promueven un mayor bienestar animal (Rushen et al., 2008; von Keyserlingk et al., 2009). Los animales están menos expuestos a infecciones derivadas del manejo de grupos en espacios reducidos, por lo que presentarían también menores riesgos de patologías relacionadas con la salud humana. Además, la utilización de pasturas en las dietas de rumiantes tiene otras ventajas que se relacionan con la calidad del producto final. Modernamente, se considera que la composición de los ácidos grasos en los tejidos animales son un factor determinante en el valor nutricional de los productos a consumir por los humanos (von Keyserlingk et al., 2009). En este sentido, es reconocido que el consumo de forrajes frescos disminuye la relación ácidos grasos (AG) saturados: AG poli-insaturados (Dewhurst et al., 2006, Lourenço et al., 2008, Warren et al., 2008) y favorece la aparición de niveles más elevados de ácido linoleico conjugado (CLA), tanto en la leche como en la carne del rumiante, particularmente del isómero cis-9, trans-11 (Arousseau et al., 2007, Lourenço et al., 2008, Warren et al., 2008). El término CLA se refiere a una serie de isómeros posicionales y geométricos del ácido linoleico que contienen un par de dobles enlaces conjugados (Palmquist et al., 2005). Está demostrado que, algunos tipos de CLA tienen propiedades como anti-carcinogénicos y anti-aterogénicos (Dedeckere et al., 1998, Steen & Porter, 2003). En los rumiantes, los CLA son producidos durante el proceso de biohidrogenación ruminal del ácido linoleico cuyo responsable principal es la bacteria *Butyrivibrio fibrisolvens* (Dhiman et al., 2005), aunque parecería que no es la única especie de este género que presenta esta propiedad (Park et al., 2011). Si bien los mayores aportes de CLA en la ingesta diaria provendrían de la leche (69%), es de destacar la importancia de la carne en la ingesta diaria de CLA representando un 24% de la ingesta total en los Estados Unidos (Ritzenthaler et al., 2001). En nuestro país, recientemente Fraga et al. (2013), lograron aislar e identificar diferentes cepas de *Butyrivibrio fibrisolvens* y *B. hungateii*, con una abundancia relativa interesante a partir del contenido ruminal de bovinos alimentados exclusivamente con pasturas templadas. Por todas estas razones, a nivel mundial existe un renovado interés en la utilización de pasturas de alta calidad administradas frescas.

Más allá de todas estas ventajas, las pasturas presentan desventajas como su disponibilidad, que puede resultar limitante en varios momentos del año, y los niveles de consumo por parte del animal, que pueden ser limitados cuando los animales consumen forrajes. Por esta razón, a pesar de sus indiscutidas ventajas, resulta necesario contar con distintas estrategias que permitan maximizar la utilización de pasturas por los ovinos ya sea a través del aumento en los niveles de consumo o de la digestión de las mismas. En este trabajo solo se hace referencia a las estrategias que fueron evaluadas.

Por un lado, y para aumentar el consumo, una de esas estrategias consiste en restringir las horas de consumo de forraje. Esta es una medida de manejo cada vez más utilizada en nuestro país, ya que además de aumentar los niveles de consumo, el encierro de los ovinos durante la noche permite mejoras en su seguridad. En general, los efectos de la restricción en el tiempo de acceso al forraje dependen de la severidad y duración de la restricción (Pérez-Ramírez et al., 2009). En un trabajo realizado en nuestro país, utilizando animales alimentados exclusivamente con pasturas durante un período de tiempo restringido a 4 horas por día, se registraron concentraciones de ácidos grasos volátiles (**AGV**) totales relativamente altas y bajos valores de pH a nivel ruminal (Cajarville et al., 2006a), los cuales podrían afectar negativamente a la actividad de la microbiota ruminal.

Con el fin de prevenir esos efectos negativos en el ambiente y actividad microbiana ruminal, otra estrategia para mejorar el aprovechamiento de las pasturas es el uso de compuestos que modulan positivamente la fermentación ruminal. Entre estos compuestos encontramos a las sustancias buffer (NRC, 2001; Krause & Oetzel, 2006). En nuestro país este tipo de aditivos se utiliza de rutina en sistemas de alimentación cuando se suministra una alta proporción de concentrados para mitigar las caídas del pH ruminal y sus consecuencias. Si bien su uso ha sido ampliamente estudiado en condiciones productivas que utilizan dietas completas (Kawas et al., 2007; Guedes et al. 2008), son escasos los trabajos que reportan el uso de este tipo de compuestos con dietas pastoriles.

Otra estrategia para aumentar el consumo consiste en combinar pasturas con dietas completas (raciones totalmente mezcladas: **RTM**). De esta manera se alternan en forma diaria períodos de pastoreo por horas con períodos de acceso a una RTM. Este sistema de alimentación, cada vez más habitual en algunos establecimientos lecheros de alta producción de nuestro país, cuenta aún con muy poca información de respaldo procedente de la investigación.

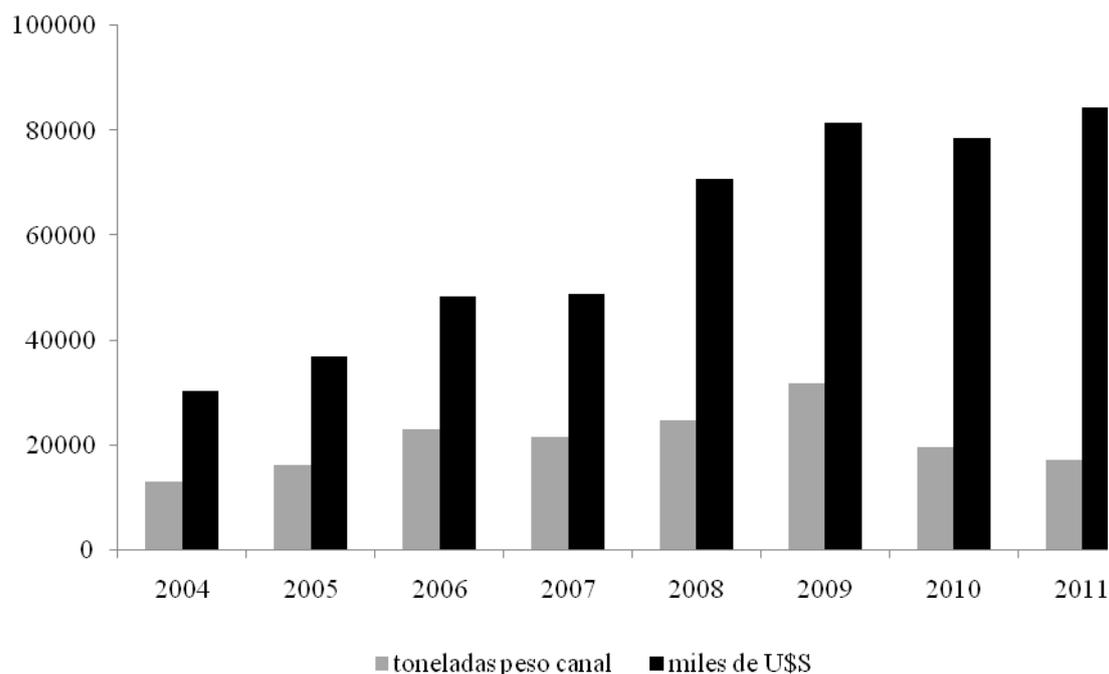
## **2. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS**

### **2.1. PRODUCCIÓN OVINA EN URUGUAY**

La producción ovina en Uruguay ha estado tradicionalmente orientada a la producción de lana en condiciones extensivas, con una baja utilización de infraestructura, recursos humanos y servicios. A pesar de la caída registrada en el stock ovino en la década de los 90, producto de una disminución internacional del precio de la lana, en los últimos años, la situación parece estar cambiando. Si bien la exportación de carne ovina en nuestro país disminuyó en los últimos años (Fig. 1), se sigue manteniendo como el tercer

exportador de carne ovina del mundo, detrás de Nueva Zelanda y Australia. Por otra parte, la demanda mundial de carne ovina es creciente y coincidente con una oferta limitada del producto, lo que hace que la misma se valore (FAO, 2005). De hecho, a pesar de la disminución en los volúmenes de exportación que se ha registrado en los últimos años, los ingresos (en miles de dólares) por la exportación de carne ovina aumentaron casi 3 veces en el período 2004/2011 (Fig. 1). Podemos decir que nuestro país actualmente se encuentra bien posicionado en los mercados internacionales de carne ovina a pesar de contar con poco volumen y de que la misma se produce fundamentalmente a partir de razas laneras. Una problemática que surge desde el sector productivo de nuestro país para producir corderos pesados (peso vivo (**PV**) superior a 34 kg, y menos de 150 días de edad), es la necesidad de contar con herramientas que permitan acelerar el crecimiento de los ovinos, fundamentalmente durante los meses de verano. En este sentido, se han evaluado distintas alternativas como el pastoreo de verdeo de soja, brassica y llantén (Bianchi et al., 2004; Bianchi & Garibotto, 2004; Garibotto & Bianchi, 2007), para engordar corderos durante el verano, alternativas intensivas de altas producciones de carne por unidad de superficie (Bianchi, 2012). De todas formas, a largo plazo no sólo será necesario aumentar los volúmenes de producción sino también destacarnos en calidad, lo que redundará en la apertura de nuevos mercados y en la obtención de mejores precios. Uruguay cuenta con la posibilidad de producir carne a cielo abierto, lo que permite atender las demandas de los mercados más exigentes (bienestar animal, seguridad alimenticia y salud humana), en forma relativamente económica (Bianchi & Garibotto, 2008). Todo esto representa sin duda una interesante oportunidad para nuestro país, que posee condiciones naturales apropiadas, así como cultura productiva en el rubro ovino.

La necesidad de producir más carne, así como la exigencia de contar con productos de alta calidad ha llevado a que los procesos de cría y engorde de corderos se intensifiquen, disminuyendo la edad de faena y aumentando a la vez el peso de los animales (Borton et al., 2005; Bianchi & Garibotto, 2006; Kremer, 2010), lo que en definitiva hace que las ganancias de PV por unidad de tiempo deban ser mayores que en el sistema de producción tradicional. El proceso de intensificación requiere cambios en el manejo de los animales, de los recursos genéticos, de los aspectos sanitarios y fundamentalmente en el manejo de la alimentación, aumentando el ingreso de nutrientes para lograr mayores ganancias de PV. En Uruguay la intensificación de la producción de carne se ha basado tradicionalmente en el uso de pasturas mejoradas. Además de la mejora en la pastura, la suplementación con granos de cereales y subproductos ha sido una herramienta para aumentar el ingreso de nutrientes al sistema. La suplementación es ampliamente utilizada sobre todo en sistemas de producción de carne bovina, aunque en los últimos años se ha incrementado su uso en sistemas de producción de carne ovina (Banchero et al., 2005; Bianchi et al., 2007; Piaggio, 2010). En otros países se utiliza el sistema a corral para la producción de carne ovina (Bowen et al., 2006) aunque en nuestro país todavía no es empleado a nivel comercial.



**Fig. 1** Exportación total de carne ovina por año (Adaptado de DIEA, 2012)

## 2.2. UTILIZACIÓN DE PASTURAS EN SISTEMAS SEMI-INTENSIVOS E INTENSIVOS DE PRODUCCIÓN

En Uruguay, la producción de forrajes de alta calidad presenta condiciones muy favorables. La base forrajera de los sistemas semi-intensivos está constituida por una importante variedad de gramíneas y leguminosas, sembradas en monocultivos o asociadas. En dichos sistemas, durante gran parte del año las praderas implantadas o los cultivos anuales presentan, en general, un elevado contenido de materias nitrogenadas, (Repetto et al., 2001; Cajarville et al., 2006b), de rápida degradación ruminal (Cohen, 2001; Repetto et al., 2005). Los niveles de fibra neutro detergente (**FND**) de este tipo de pasturas varían según las especies forrajeras que se utilicen y su contenido de carbohidratos solubles (**CHS**) es variable, principalmente de acuerdo a la hora del día (Antúnez & Caramelli, 2009).

Cuando los rumiantes ingieren este tipo de pasturas, a nivel ruminal se generan elevadas concentraciones instantáneas de amoníaco (**N-NH<sub>3</sub>**), con valores que oscilan entre 25 y 45 mg/dL para ovinos (Pérez-Ruchel, 2006; Tebot et al., 2008; Aguerre et al., 2009a) y entre 15 y 30 mg/dL para bovinos (Khalili & Sairanen 2000; Cajarville et al., 2006b; Aguerre, 2010). Y, las mismas proveen a los microorganismos ruminales de un sustrato de rápida fermentescibilidad (Repetto et al., 2005; Repetto et al., 2010), con concentraciones máximas de AGV totales a la hora 4 en relación al inicio de la ingesta (Pérez-Ruchel, 2006). Además, la digestibilidad de la materia seca (**MS**) de este tipo de pasturas ha sido elevada, superior a 70%, debido a la elevada digestibilidad de la fibra (Aguerre et al, 2009b; Tebot et al., 2012). Por todas estas características, podemos decir que las pasturas templadas representan una muy buena fuente de nutrientes para los rumiantes.

Sin embargo, la alimentación exclusivamente pastoril presenta limitantes. Además de la necesidad de contar con suficiente superficie para ser utilizada en forma de pastoreo, las

fluctuaciones en la disponibilidad y calidad de forraje que se dan a lo largo del año dificultan la obtención de rendimientos estables y preestablecidos. Según Kolver (2003), cuando los animales son alimentados únicamente con pasturas, su potencial productivo no es explotado completamente. Esto es debido a factores como la limitación en el tiempo requerido para actividades de búsqueda, cosecha y rumia del forraje ingerido; restricciones físicas, o como la alta cantidad de agua ingerida con la pastura (Chilibroste et al., 2005; Dillon, 2006), su baja concentración energética, altos contenidos de humedad y fibra que pueden resultar en bajos niveles de consumo de MS y energía por parte de los animales (NRC, 1996). Además, la utilización de forrajes de buena calidad genera una desincronización entre la disponibilidad de energía y aminoácidos en el rumen (Wales et al., 2013). Los forrajes en general presentan una relativa baja concentración energética en relación a su aporte en proteínas. Su abundancia en proteínas de alta degradabilidad lleva a altas concentraciones instantáneas de amonio (N-NH<sub>3</sub>) en el rumen que no puede ser aprovechado dada la baja disponibilidad de cadenas carbonadas, representando una pérdida de materias nitrogenadas (Cajarville et al., 2006b).

### 2.3. ESTRATEGIAS PARA MAXIMIZAR LA UTILIZACIÓN DIGESTIVA DE LAS PASTURAS

#### 2.3.1. Manejo del tiempo de acceso a las pasturas

El tiempo de acceso a las pasturas representa uno de los factores que afectan su aprovechamiento por el rumiante. En algunos sistemas de pastoreo ovino, el consumo de forraje es restringido durante gran parte del año, principalmente para optimizar el uso del forraje (Coleman & Henry, 2002). Además de mejorar el manejo de la pastura, la restricción en el tiempo de acceso a la misma se efectúa para cuidar de los animales (por ejemplo protegerlos de predadores).

En general, cuando los animales son sometidos a una restricción en el tiempo de acceso al alimento, o lo que es igual, presentan una baja frecuencia diaria de alimentación, existen períodos de ayuno más o menos prolongados. Frecuentemente, al finalizar dichos períodos de ayuno los animales ingieren el alimento ofrecido con una mayor voracidad, o a un ritmo de ingestión más acelerado (Forbes & Mayes; 2002). De esta manera, la fermentación ruminal del alimento ingerido, produce en general grandes cantidades de AGV totales. Las altas concentraciones de AGV generan una disminución del pH ruminal, que puede persistir por algunas horas. Posteriormente, el pH ruminal vuelve a aumentar, debido a la remoción de AGV, o al aporte de sustancias buffer procedentes principalmente de la saliva generada mediante la rumiación del material ingerido (Palmonari et al., 2010).

En la literatura existen ciertas contradicciones acerca de los efectos de la reducción del tiempo de acceso al alimento en los animales. Parecería que los efectos de la restricción varían según la duración de la misma. Dehority & Tirabasso (2001), estudiando los parámetros ruminales y las concentraciones de bacterias y hongos en ovejas alimentadas 1, 6 o 24 veces por día con una dieta peleteada con un alto contenido de fibra, no encontraron grandes diferencias entre tratamientos, por lo que sugieren que las concentraciones de microorganismos a nivel ruminal no serían influenciadas por la frecuencia diaria de alimentación. Gekara et al. (2005), trabajando con ganado de carne a pastoreo durante 24 o 12 h por día, indicaron que los animales con 12 horas de acceso

al forraje compensaron la restricción mediante un aumento de su tasa de ingestión en el mismo rango en que disminuyó el tiempo de pastoreo. Mientras tanto, estudios realizados con vacas lecheras reportan que el consumo de MS (Kennedy et al., 2009) y la producción de leche (Kristensen et al., 2007; Delagarde et al., 2008) generalmente son reducidos cuando el tiempo de acceso al forraje diario es menor de 8 h. Si bien en todos estos trabajos se estudió el tiempo de acceso al forraje, éste no constituyó el único alimento de la dieta de los animales. Pérez-Ramírez et al. (2009) trabajaron con vacas lecheras a pastoreo sin suplementación sometidas a una restricción en el tiempo de acceso al forraje de 9 h en 1 sesión o de 5,5 h en 2 sesiones. Estos autores hallaron que los animales con restricción fueron incapaces de mantener el consumo de MS y la producción de leche cuando se los comparó con vacas sin restricción en el tiempo de acceso al forraje. En nuestro país, trabajando con ovinos alimentados exclusivamente con una pastura administrada durante 4 horas al día, se registró una disminución del pH ruminal posterior a la alimentación que persistió durante varias horas del día (Cajarville et al., 2006a; Pérez-Ruchel, 2006).

Una alta frecuencia de alimentación reduciría las fluctuaciones en el ambiente ruminal posterior a la alimentación, lo que promovería una mayor eficiencia de fermentación (Castro et al., 2002; Freer et al., 2007). Sin embargo, algunos autores opinan que una elevada frecuencia de alimentación, podría conducir a un aumento de la ingesta de MS que en última instancia se traducirá en una disminución del pH ruminal (Oetzel & Nordlund, 1998). No obstante, en esta situación generalmente la capacidad del rumen para absorber rápidamente los AGV estabiliza rápidamente al pH ruminal (Krause & Oetzel, 2006). Según Kozloski et al. (2009) una alta frecuencia de alimentación aumentaría la disponibilidad de N y energía en el rumen en diferentes momentos del día, con lo cual podría aumentar la síntesis de proteína microbiana (**SPM**) a nivel ruminal. Ruiz & Mowat (1987) encontraron que la digestibilidad de la dieta y la retención de N en ganado alimentado con una dieta con un alto porcentaje de forraje, fueron mayores para animales alimentados 4 veces por día respecto a 1 vez, pero solamente cuando la cantidad de alimento fue restringida, no cuando el consumo fue *ad libitum*. Gibson (1981) concluyó que la ganancia de PV de novillos aumentaría cuando el alimento es administrado en 4 o más comidas diarias respecto a 1 o 2 comidas diarias registrándose un efecto similar en ovinos. Este autor, indicó además, que esta respuesta ocurriría principalmente en animales jóvenes (bovinos de menos de 200 kg de PV y ovinos de menos de 1 año de edad).

En una revisión de la información generada por nuestro equipo de investigación, a partir de 6 experimentos realizados en forma independiente, con 13 tratamientos experimentales diferentes, utilizando diferentes especies y categorías animales, cuya premisa fue la utilización de un mínimo de 60% de forraje fresco en la dieta de los animales, se observó que el pH ruminal de los animales, en general, varió según la frecuencia de alimentación a la que fueron sometidos los animales (Cajarville et al., 2006c). Aquellos animales con una baja frecuencia diaria de alimentación (1 o 2 veces por día) presentaron niveles de pH ruminal inferiores a 6,2 durante gran parte del día, a diferencia de los animales alimentados con una alta frecuencia de alimentación (4 o más veces por día). Si consideramos que 6,2 es el valor mínimo considerado como el óptimo necesario para una adecuada actividad microbiana, sobre todo para los microorganismos fibrolíticos (Krause & Oetzel., 2006; Dewhurst et al., 2006), podemos pensar que una baja frecuencia de suministro de forraje podría afectar negativamente la digestión de las pasturas.

Por lo expuesto anteriormente y, considerando que el mantenimiento de un ecosistema ruminal saludable es indispensable para la actividad fermentativa microbiana y la digestión de los forrajes, cuando se utilizan pasturas templadas de alta calidad en la dieta de los rumiantes el tiempo de acceso a las mismas resulta un factor fundamental.

### *2.3.2. Utilización de sustancias buffer como moduladores de la fermentación*

La adición a la dieta del rumiante de compuestos moduladores de la fermentación ruminal, representa una estrategia que se emplea para modificar los procesos digestivos y metabólicos del animal, aumentando la eficiencia de utilización de los alimentos (Carro & Ranilla, 2002). Entre los distintos tipos de aditivos, los antibióticos han sido de los más utilizados. Sin embargo, su uso ha ido disminuyendo desde el año 2006, en algunos países (Manero et al., 2006) debido a las prohibiciones que se han establecido con respecto su uso, debido a la resistencia a los mismos que se ha generado por las bacterias patogénicas para el humano. Esto ha repercutido en un aumento en el uso de otro tipo de aditivos. Entre ellos, uno de los más utilizados en la práctica y desde hace unos cuantos años han sido las sustancias con poder tampón o buffer.

Las sustancias buffer son sustancias que causan resistencia a cambios en el pH de una solución (como el bicarbonato sódico, carbonato sódico, y carbonato cálcico). En condiciones fisiológicas, para ser considerados como buffers deben cumplir tres requisitos: ser solubles en agua, ser ácidos o bases débiles, y tener una constante de disociación ( $pK_a$ ) cercana al pH fisiológico del sistema a ser bufferado (Erdman, 1988).

Dado sus características, estas sustancias se emplean como aditivos. En el caso del rumen, el mecanismo de acción específico no está claramente definido. Los mismos actuarían resistiéndose a los cambios en las concentraciones de hidrogeniones, tamponando los hidrogeniones producidos a nivel ruminal y/o diluyendo su contenido (McDonald et al., 2006). En general, su uso beneficiaría a los animales en distintas circunstancias, como por ejemplo cuando son alimentados a intervalos poco frecuentes o con dietas muy fermentescibles (NRC, 2001).

El bicarbonato de sodio ( $\text{NaHCO}_3$ ) es el buffer más comúnmente utilizado en alimentación de rumiantes (Krause & Oetzel, 2006; Enemark, 2008; Bodas et al., 2009) en forma aislada o combinado con otras sustancias. Este compuesto, generalmente, es reconocido como un buffer eficiente, debido a su elevada capacidad para estabilizar el pH del rumen (NRC, 2001).

El óxido de magnesio ( $\text{MgO}$ ) es una sustancia alcalinizante. Si bien en la práctica es considerado como un buffer, no cumple con todos los requisitos necesarios para ser considerado como tal: no tiene un  $pK_a$  definido y tiende a ser relativamente insoluble en agua. De todas formas, su empleo en situaciones de riesgo de acidosis ha sido efectiva. En diversos estudios realizados con vacas en lactación, alimentadas con dietas con una elevada proporción de concentrados y baja de fibra, la utilización de  $\text{MgO}$  ha aumentado el contenido de grasa de la leche (Thomas & Emery, 1969; Xin et al., 1989). Cuando el  $\text{MgO}$  ha sido utilizado en combinación con el  $\text{NaHCO}_3$ , las respuestas han sido aditivas (Erdman et al., 1982).

Con respecto al modo de acción de los buffers, existe una inconsistente relación entre la suplementación con buffers y las variables fisiológicas y metabólicas. Por esta razón algunos autores proponen como posible mecanismo de acción al aumento del consumo de agua, aumentando la dilución del fluido ruminal (Russell & Chow, 1993). Otros autores indican que el efecto del NaHCO<sub>3</sub> aumentando el pH ruminal no se explicaría completamente por los efectos de la dilución (Kohn & Dunlap, 1998). Según estos autores, la adición de NaHCO<sub>3</sub> resultaría en la liberación de CO<sub>2</sub> de la solución y eventualmente del rumen vía eructación. Este proceso neutralizaría directamente la acidez ruminal. El grado de esta neutralización depende de la presión parcial de CO<sub>2</sub> en la fase gaseosa, del pH y de una constante (7,74), de acuerdo a la ecuación de Henderson-Hasselbalch:  $\text{pH} = 7,74 + \log \left( \frac{[\text{HCO}_3^-]}{\text{presión de CO}_2 \text{ en la atmósfera}} \right)$ .

Los buffers en general, mantienen el pH en los rangos adecuados para lograr una actividad microbiana eficiente (Krause & Oetzel, 2006). Además, se han constatado efectos positivos relacionados con esta estabilidad. En vacas lecheras alimentadas con dietas poco fibrosas, se han constatado aumentos en el contenido de grasa de la leche, tras la adición de buffers (Erdman, 1988). Los aumentos en el porcentaje de grasa de la leche se asocian con incrementos en la digestión de la FND y fibra ácido detergente (FAD), lo cual genera una mayor relación acetato: propionato. Kawas et al. (2007), trabajando con corderos en terminación, alimentados con una dieta rica en concentrados, encontraron que la adición de NaHCO<sub>3</sub> en la dieta aumentó el consumo de MS de los animales. En animales alimentados con dietas constituidas primordialmente con silo de maíz, se han observado, además de aumentos en la ingesta, aumentos en la producción de leche tras la adición de NaHCO<sub>3</sub>, MgO y otros buffers (Erdman, 1988). Santra et al. (2003), evaluando la inclusión de distintas proporciones NaHCO<sub>3</sub> en una dieta altamente concentrada en corderos, observaron que dicha inclusión aumentó la digestibilidad de la celulosa, el número de protozoarios ciliados, el pH ruminal y la concentración total de N, resultando en un mayor crecimiento de los animales. Sin embargo, también existen trabajos en los que la adición de buffers en la dieta, ya sea rica en concentrados (Tripathi et al., 2004) como basada en heno o ensilado de gramíneas y leguminosas (Erdman, 1988; NRC, 2001), ha generado una respuesta prácticamente nula tanto en la digestibilidad de la dieta como en la producción animal.

En nuestro país, los datos generados resultan, en algunos aspectos, contradictorios. Trabajando con pasturas de calidad comparable y niveles bajos de suplementación existen comunicaciones de valores de pH ruminal estables y cercanos a los óptimos (Repetto et al., 2000), mientras que otras (como ya se mencionaron) destacan momentos del día con valores de pH inferiores a los recomendables, así como picos elevados de concentración de AGV (Cajarville et al., 2000 y Cajarville et al., 2006a) los cuales podrían afectar negativamente la actividad de la microbiota ruminal. En esos casos, podría ser útil la utilización sustancias buffer con el fin de estabilizar la fermentación ruminal. Dalley et al. (2001), trabajando con vacas lecheras en pastoreo, con altos niveles de pastura muy degradable, determinaron el impacto de la suplementación con granos o con buffers en las condiciones ruminales y composición de la leche. Estos autores encontraron que la adición de bicarbonato de sodio (buffer) redujo la depresión del pH ruminal 1 a 2 horas luego de la dosificación.

A partir de lo expuesto anteriormente es importante resaltar que si bien existe información disponible acerca del uso de aditivos moduladores de la fermentación ruminal en rumiantes, como las sustancias buffer, es muy escasa la información

disponible acerca de la utilización de estos compuestos en animales alimentados exclusivamente con pasturas.

### *2.3.3. Combinación de pasturas con otros alimentos*

La suplementación de pasturas con granos de cereales es una estrategia muy utilizada a nivel mundial, con el fin principal de adicionar energía y permitir el uso de altas cargas animales. Esta suplementación con concentrados energéticos, generalmente conduce a un aumento del consumo de MS total y a su vez trae aparejada la disminución del consumo de forraje, o sea la sustitución de forraje por concentrado (Reis & Combs, 2000; Bargo et al. 2002). Sin embargo, existen trabajos en los que se intentó mejorar el aprovechamiento del forraje de una pastura templada, incrementando la eficiencia de SPM mediante la inclusión de almidones u otros carbohidratos no estructurales (CNE) pero, en general no se logró (García et al., 2000; Aguerre 2010; Tebot et al., 2012). Existirían factores intrínsecos de la pastura que contribuirían a mejorar la eficiencia de utilización de la energía en el rumen (Repetto et al., 2010; Tebot et al., 2012).

Por otra parte, se debe considerar que la inclusión de altos niveles de concentrados en la dieta pueden conducir a disminuciones del pH ruminal e inducir a estados de acidosis ruminal subaguda (o SARA), que es por lejos la principal patología que afecta a los animales en confinamiento. Los ovinos en particular son más susceptibles que los bovinos a la aparición de acidosis. De hecho, Aguerre et al. (2013), trabajando en forma simultánea con terneros y corderos, observaron disminuciones más pronunciadas en el pH ruminal, en el consumo y en la digestibilidad de la fibra en corderos que en bovinos al aumentar el nivel de CNE en la dieta.

El uso de RTM presenta ventajas que superan a las de la suplementación con concentrados. Las RTM son una mezcla compuesta por forrajes (principalmente ensilajes o fardos) y alimentos concentrados (granos y subproductos), que se ofrece como alimento único y están formuladas para cubrir con las necesidades de los animales. El uso de RTM tiene algunas ventajas reconocidas, ya que disminuye la selección de componentes de la ración por parte de los animales y permite un adecuado balance de los nutrientes ingeridos, sincronizando su disponibilidad a nivel ruminal (Gill, 1979) y, permitiendo controlar los problemas de acidosis, sobre todo la SARA.

Este tipo de dieta es utilizada fundamentalmente en sistemas de engorde a corral. El uso de RTM, además de permitir liberar superficie en el predio para ser utilizada en otras actividades, permite aumentar el ritmo de ganancia de peso y promover tipos de carcasas diferenciales a través del manejo de las cantidades y el tipo de energía que consumen los animales. En general, el consumo de nutrientes y particularmente de energía por parte de los animales cuando son alimentados con RTM, es mayor respecto a animales a pastoreo o pastoreo con suplementación (Annison et al., 2002).

En varias regiones de Sud América, este tipo de dieta es cada vez más empleada en la práctica debido a la creciente demanda de productos y a la competencia que existe por el recurso tierra con la agricultura y la forestación. En nuestro país, en ovinos, el tema es muy incipiente, si bien ya existen antecedentes de trabajos que utilizan raciones totalmente mezcladas con diferentes características para el engorde de corderos (Piaggio et al., 2013).

Por todo lo dicho anteriormente, es indiscutible que la utilización de RTM permite obtener muy buenos resultados productivos en los sistemas más intensivos, mejores que con la utilización exclusiva de pasturas o que con la suplementación con concentrados. Sin embargo, si consideramos que en los sistemas más intensivos de Uruguay la utilización de pasturas aún representa el factor común y las grandes ventajas que presenta la utilización de pasturas en cuanto al ambiente, a los animales y a las características del producto final destinado al consumo humano, la inclusión de pasturas en los sistemas intensivos de producción resulta muy beneficiosa.

La combinación de dietas tipo RTM que alternan en forma diaria con pastoreo por horas (combinación de sistemas de corral y pastoril) tendría la virtud de combinar los aspectos positivos de ambos sistemas, ya que permitiría estabilizar la oferta de alimento a lo largo del año y corregir las deficiencias de la pastura en cuanto al aporte de nutrientes, manteniendo a la vez las características esenciales de los sistemas bajo pastoreo. Este tipo de alimentación, cada vez más habitual en algunos establecimientos lecheros de alta producción de nuestro país, y que alterna en forma diaria períodos de pastoreo con otros de consumo de RTM, propuesto inicialmente para vacas lecheras y denominado por Bargo et al. (2002) sistema **RPM** (ración parcialmente mezclada), representa una alternativa poco estudiada hasta el momento. Wales et al. (2013), revisaron los trabajos realizados con este tipo de sistemas en vacas lecheras, y comunicaron que en general, cuando el consumo de pastura es bajo (no más de 25 % de inclusión de pastura en la dieta) las vacas aumentaron la eficiencia de conversión alimenticia, el consumo de MS y la producción de leche. Sin embargo, estos autores indican la escasa información disponible sobre el tema, y la ausencia de datos, por ejemplo para mayores niveles de inclusión de pastura.

Nuestro equipo ha comenzado a explorar esta línea de trabajo en bovinos de carne y vacas de leche. Santana et al. (2011) evaluaron el efecto de combinar el uso de pasturas con dietas clásicas de confinamiento en bovinos en crecimiento, ofreciendo pradera durante un tiempo restringido en el día a terneras que consumían una dieta base tipo RTM. El agregado de pradera permitió aumentar el consumo de MS hasta niveles de más del 3,5 % del PV. La ingestión de los animales alimentados con RTM y pastura fue 24% más alta que la de alimentados únicamente con RTM, y 44% superior a la alcanzada por los animales alimentados únicamente con pradera. Este resultado se observó sin disminuciones de la digestibilidad ni variaciones importantes del pH ruminal. Paralelamente, Mendoza et al. (2012 a y b) trabajando con vacas lecheras de alta producción, observaron que el consumo y la producción eran similares en vacas que consumían RTM o en las que ésta era sustituida parcialmente por raigrás. Mientras que, recientemente, Pomiés (2014) trabajando también con vacas lecheras de alta producción alimentadas con diferentes combinaciones de RTM y raigrás, encontró resultados similares entre vacas alimentadas solo con RTM y con un nivel de inclusión de forraje de 25%. Pero registró un efecto negativo en los niveles de consumo de nutrientes (MO, PB, FND) para el mayor nivel de inclusión de forraje (50%).

En ovinos este tema ha sido menos estudiado que en bovinos. Algunos trabajos comparan el uso de RTM con el pastoreo, pero no su combinación (Murphy et al., 1994; Carrasco et al., 2009; Jacques et al., 2011). Otros han evaluado el empleo de RTM combinada con pastoreo, pero administrados en momentos diferentes de la vida de los animales (Aurousseau et al., 2007; Alvarez-Rodriguez et al., 2008; Carrasco et al.,

2009; Jacques et al., 2011). En todos estos trabajos se evaluó el crecimiento y/o características del producto final, reportándose en general, que la composición de la carne de los animales alimentados únicamente con forraje presenta características más saludables para el consumo humano.

Tanto los resultados primarios obtenidos para bovinos como para ovinos abren expectativas interesantes, en el sentido que parecería posible aprovechar los potenciales beneficios de la intensificación de los sistemas de alimentación a corral, contemplando simultáneamente aspectos valiosos de nuestros sistemas de producción como son la seguridad alimentaria, el bienestar animal, el ambiente y las características del producto final, con la inclusión de pasturas en las dietas. Es de considerar, en este sentido, la estrategia que ha elegido nuestro país para promocionar su carne como sana, ambientalmente apta y éticamente aceptable, además de tierna y sabrosa (Blasina, 2010). Nuestros productos cárnicos están muy bien posicionados actualmente en el mercado internacional, tanto por el status sanitario logrado como por el modo de producción a pasto y cielo abierto, que explican una buena parte del valor agregado. Nuestro país debe estudiar la forma de lograr los máximos resultados productivos - capaces de atender a la demanda creciente-, contemplando algunos de los aspectos mencionados que hacen que los productos uruguayos apunten a mercados de alta exigencia con un estilo marcadamente propio. Resulta necesario generar más información acerca del impacto sobre el consumo y la digestión de los nutrientes de combinar momentos de ingesta de pasturas y de RTM a lo largo del día, así como de los niveles de pastura que permitan revelar sus aspectos positivos.

### **3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

A partir de la información disponible y, pensando en mejorar el aprovechamiento de las pasturas de alta calidad y maximizar la producción ovina, hay algunas preguntas que surgen y que al día de hoy no es posible responder:

La inclusión de pasturas de alta calidad a una dieta balanceada tipo RTM, ¿podrá favorecer la utilización de nutrientes sin perjudicar el consumo total de alimentos?

La restricción en el tiempo de acceso al alimento, ¿afectará negativamente a la degradación de la fibra aún en animales consumiendo exclusivamente pasturas? Si es así, ¿es posible mitigar los efectos negativos empleando compuestos buffer, tal como se realiza en los sistemas que utilizan dietas con alto nivel de concentrados?

El presente trabajo intenta abocarse a aportar información relevante acerca de las interrogantes planteadas.

### **4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

#### **4.1 HIPÓTESIS**

La inclusión de pasturas en ovinos consumiendo dietas balanceadas a base de ensilaje de forraje y concentrados mejora el ambiente ruminal incrementando la digestibilidad de la dieta.

Sin embargo, aún en animales consumiendo exclusivamente pasturas, la restricción en el tiempo de acceso al alimento provocará alteraciones en el ecosistema ruminal que afectarán negativamente a la digestión de la fibra.

En estas situaciones de restricción del tiempo de acceso a pasturas, la adición de sustancias buffer puede ser una herramienta de utilidad para paliar los posibles efectos negativos que se puedan generar en el ecosistema ruminal y en la digestión del forraje.

#### 4.2. OBJETIVO GENERAL

Evaluar diferentes estrategias de alimentación que tiendan a aumentar el consumo y la utilización digestiva de forrajes frescos en ovinos.

#### 4.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Estudiar si el tiempo de acceso al forraje o la inclusión de forraje fresco a una RTM afectan el ecosistema ruminal.

Estudiar si la adición de buffers a una dieta netamente forrajera o la inclusión de forraje fresco a una RTM afectan la digestión y el consumo de nutrientes por parte de los animales.

### **5. ESTRATEGIA DE LA INVESTIGACIÓN**

En base a las hipótesis y objetivos planteados se realizaron 3 experimentos.

En el **Experimento I** se evaluó el uso de un forraje fresco de una pastura templada como único alimento en la dieta de los animales, en particular, el tiempo de acceso al mismo, y el agregado o no de sustancias buffers.

Este trabajo forma parte de una serie de estudios acerca de los efectos de restringir el tiempo de acceso al forraje sobre el aprovechamiento digestivo en rumiantes y es la continuación a mi Tesis de Maestría (Pérez-Ruchel, 2010).

Los objetivos específicos de este experimento fueron:

Estudiar si una restricción en el tiempo de acceso a una pastura de alta calidad afecta negativamente a los microorganismos ruminales de los borregos que la consumen.

En esa situación, estudiar si la adición de buffers:

- repercute favorablemente o no en el consumo y la digestión de los borregos;
- estabiliza el ambiente ruminal, aumenta la actividad fermentativa ruminal y mejora la utilización del nitrógeno.

De este experimento surgieron 2 artículos:

**Experimento Ia-** Artículo publicado: “Use of NaHCO<sub>3</sub> and MgO as additives for sheep fed only pasture for a restricted period of time per day: effects on intake, digestion and the rumen environment”. Pérez-Ruchel A.; Repetto J.L.; Cajarville C. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, v.:98, p.: 1068-1074, 2014a (ANEXO I).

**Experimento Ib-** Artículo publicado: “La restricción en el tiempo de acceso al forraje en ovinos alimentados con pastura de buena calidad afecta algunos grupos microbianos ruminales”. Pérez-Ruchel A.; Repetto J.L.; Fraga M.; Perelmuter K.; Zunino P.; Cajarville C. *Veterinaria (Montevideo)*, v.: 50 (194), p.: 22-33, 2014b (ANEXO II).

El **Experimento II** fue conducido para evaluar el efecto de la suplementación de forraje fresco a corderos alimentados con una ración totalmente mezclada (RTM) sobre el consumo, la digestión y el ambiente ruminal.

Los objetivos específicos de este experimento fueron:

Estudiar el efecto de la inclusión de forraje fresco de una pastura de alta calidad a una RTM, en ovinos en crecimiento, sobre:

- el comportamiento ingestivo, el consumo, y la digestión de la dieta;
- la actividad fermentativa ruminal.

De este experimento surgió 1 artículo:

**Experimento IIa-** Artículo enviado a la revista *Animal*: “Supplementing high quality fresh forage to growing lambs fed a total mixed ration diet led to higher intake without altering nutrient utilization”. Pérez-Ruchel A.; Repetto J.L.; Cajarville C. 2015. (ANEXO III).

El **Experimento III** (complementario al Experimento II) fue conducido para evaluar el efecto de la suplementación de forraje fresco a corderos alimentados con una RTM sobre la actividad de las bacterias fibrolíticas del rumen de los animales.

El objetivo específico de este experimento fue:

Estudiar si la inclusión de forraje fresco de una pastura de alta calidad a una RTM afecta la actividad fibrolítica de las bacterias ruminales en ovinos.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

Los procedimientos experimentales fueron realizados de acuerdo a los principios bioéticos y protocolos de supervisión propuestos por la Comisión Nacional de Experimentación Animal (CNEA).

Los 3 experimentos tienen en común que fueron realizados con ovinos y que la dieta base de los animales fue forraje fresco de una pastura templada. En la Fig. 2 se presenta un esquema del protocolo experimental.

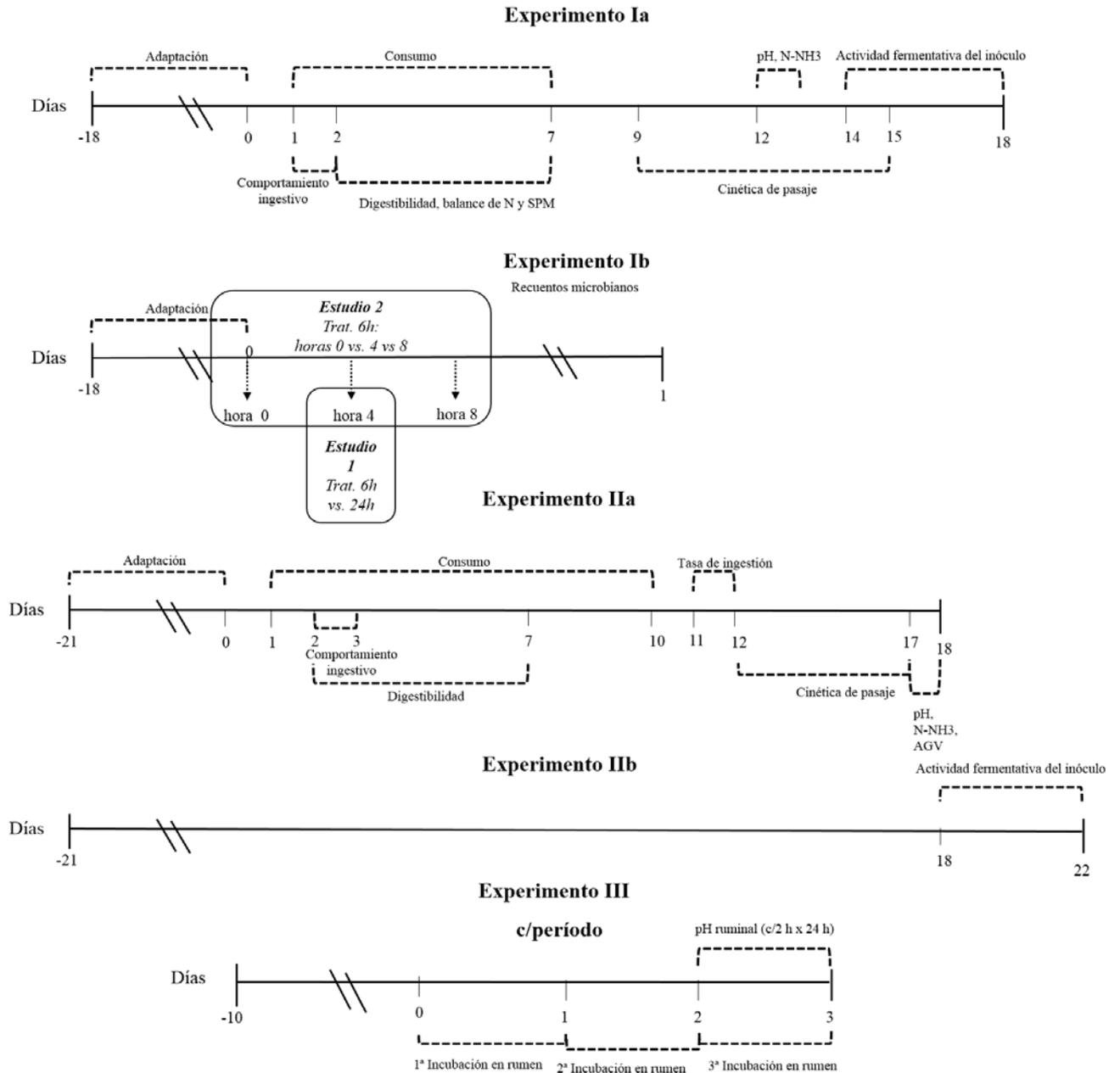


Fig. 2 Esquema del protocolo experimental

## 6.1. EXPERIMENTO I

El Experimento I se llevó a cabo en el Campo Experimental de Libertad (latitud: 34°40.65'S, longitud 56°32.35'O) y en el laboratorio de Nutrición Animal de la Facultad de Veterinaria.

### *Animales, dietas y diseño experimental*

Se utilizaron 18 borregos (1 a 2 años de edad), Corriedale x Milchschaf (46,9 ± 6,06 kg de PV). Los animales fueron alojados en jaulas metabólicas individuales, bloqueados por PV (6 bloques) y distribuidos al azar en 3 grupos con alimentación diferente: **24h** = acceso al forraje durante todo el día, **6h (Control)**= acceso al forraje durante un período de tiempo restringido de 6 h por día (7:00 – 13:00 h) y **6h+B (Buffer)**= acceso al forraje durante un período de tiempo restringido de 6 h por día (7:00 – 13:00 h) y suplementados con buffer. Cuatro borregos por tratamiento (correspondientes a 4 bloques) fueron fistulizados y se les colocó una sonda ruminal permanente.

El buffer consistió en una mezcla de 75% de NaHCO<sub>3</sub> y 25% de MgO (Codenor S.A, Montevideo, Uruguay), con un contenido de 205,5 g de Na/kg MS y 150 g Mg/kg MS, y fue ofrecido vía oral antes de la comida a una dosis de 20 g/kg de **MSI** (materia seca ingerida), la cual fue calculada en base a la cantidad de forraje consumido el día previo. Todos los animales fueron alimentados únicamente con forraje proveniente de una parcela con una pastura templada en estado vegetativo compuesta por 700 g/kg MS de *Lotus corniculatus*, 180 g/kg MS de *Trifolium* spp., 50 g/kg MS de *Lolium multiflorum* y 70 g/kg MS de forraje muerto y hiervas, con 298 g/kg MS. La disponibilidad inicial de la pastura fue de 2065 kg de MS/ha, y el forraje contenía (g/kg de MS): materia orgánica (**MO**), 886; FND, 444; fibra ácido detergente (**FAD**), 285; proteína bruta (**PB**), 128; lignina ácido sulfúrico (**Lignina (as)**), 71, Na, 0,3; K, 16,0; Cl, 0,4, y S, 0,5. La diferencia catión anión de la dieta (**DCAD**) fue 410,8 meq/kg MS. El forraje fue cortado diariamente a las 07:00 h (5 cm de altura desde el suelo) e inmediatamente ofrecido *ad libitum*. Para el grupo 24h, cada día se refrigeró el forraje cortado para ofrecerlo luego de la hora 6 en relación al inicio de la ingesta. Los animales tuvieron libre acceso al agua de bebida en bebederos y se les ofreció el forraje fresco sin restricción de cantidad durante el tiempo establecido para cada tratamiento (todo el día o 6 h por día).

El experimento consistió en un diseño de bloques completos al azar, con 18 días de adaptación a las condiciones experimentales, y un período de muestreo de 19 días.

Como se mencionó anteriormente, los datos de este experimento fueron publicados en 2 artículos. El primero (Experimento Ia) abarca el estudio del agregado o no de buffers en los animales sometidos a restricción en el tiempo de acceso al forraje, para lo cual se trabajó con 12 animales: 6 del tratamiento 6h (Control) y 6 del tratamiento 6h+B (Buffer). El segundo (Experimento Ib) abarca el estudio del efecto de la restricción o no del tiempo de acceso a la pastura sobre la microbiota ruminal. Para el cual se utilizaron 6 animales: 3 del tratamiento 24h y 3 del tratamiento 6h.

### *6.1.1. Experimento Ia*

#### *6.1.1.1. Mediciones:*

El primer día del período de mediciones se evaluó el comportamiento ingestivo de los animales (Fig. 2) a través de observaciones directas realizadas por 4 observadores entrenados cada 3 minutos desde las 8:00 a las 14:00 h. Las actividades fueron categorizadas como ingestión (búsqueda de alimento, cosecha y masticación), rumia (masticación del bolo de comida regurgitado) o descanso (cuando no mostraban ninguna de las otras 2 actividades). Se calculó la duración (minutos) de cada actividad hasta la hora 6 en relación al inicio de la comida.

El consumo de agua y de forraje fue medido desde el día 1 al 7 (Fig. 2), midiendo diariamente el volumen de agua consumida y pesando el forraje ofrecido y rechazado. Diariamente se pesó la excreción fecal total individual desde el día 2 al 7 para poder determinar la digestibilidad de los nutrientes. Se colectaron diariamente muestras de heces de cada borrego, y muestras de forraje y rechazos, que luego fueron secadas en una estufa de aire forzado a 60 °C y molidas a un tamaño de malla de 1 mm. A partir de las muestras de materia fecal de cada borrego se confeccionaron muestras compuestas (“pooles”) para su posterior análisis.

La excreción total de orina fue colectada, en recipientes conteniendo 100 mL de ácido sulfúrico 1,8 M, y medida diariamente desde el día 2 al 7 (Fig. 2). Diariamente se extrajeron muestras de 100 mL de cada borrego y se almacenaron congeladas hasta su análisis. A partir de las muestras de orina de cada borrego se confeccionaron muestras compuestas (“pooles”) para su posterior análisis.

La tasa de pasaje de la fracción particulada de la dieta a través del tracto gastrointestinal fue estimada usando fibra cromo mordante (**FCM**) preparada de acuerdo a Udén et al. (1980). La FCM fue administrada a los borregos en una sola dosis de 20 g, vía oral, durante el día 9 (Fig. 2). Se colectaron muestras fecales directamente del recto a 0, 12, 24, 30, 34, 38, 42, 48, 60, 72, 96, 120 y 144 h a partir de la administración de la FCM, luego se secaron en estufa de aire forzado a 55 °C, se molieron a un tamaño de malla de 1 mm, y se almacenaron para su posterior análisis.

El día 12 (Fig. 2) se extrajeron muestras de líquido ruminal hora a hora durante 24 h, a partir de los borregos fistulizados. El pH ruminal fue medido inmediatamente luego de la extracción, utilizando un pH metro digital (eChem Instruments Pte. Ltd., Oakton, Singapore) y una alícuota de 10 mL fue mezclada con 10 mL de cloruro de sodio (20%, p/v) y almacenada congelada para la posterior determinación de la concentración de N-NH<sub>3</sub>.

El día 14 (Fig. 2) se extrajo líquido ruminal de cada borrego fistulizado, 2 horas luego del inicio de la comida, se mezcló dentro de cada tratamiento y se utilizó como inóculo para evaluar la actividad fermentativa por medio de la incubación *in vitro* de un sustrato fibroso (paja de trigo).

#### 6.1.1.2. Análisis químicos, determinaciones y cálculos:

Las muestras de forraje (ofertas y rechazos) y pooles de material fecal fueron analizadas para MS, MO, N, FND, y FAD, mientras que cada pool de orina fue analizado para N y derivados de purina. Los contenidos de MS, MO, y N fueron analizados de acuerdo a AOAC (1990; métodos ID 934.01, ID 942.05 y ID 955.04, respectivamente). La FND y

FAD fue analizada de acuerdo a Robertson & Van Soest (1981), utilizando un equipo analizador de fibras Ankom (Ankom Technology Corporation, Macedon, NY, USA) sin amilasa y expresadas incluyendo las cenizas residuales. El contenido de lignina (as) fue analizado de acuerdo a AOAC (1990; método ID 973.18). Los análisis de Na, K, Cl y S del forraje se realizaron de acuerdo a Da Silva (1999). La DCAD (mEq/kg MS) fue calculada según Jackson et al. (2001) como:

$$((\text{g/kg Na}/0,0023) + (\text{g/kg K}/0,00391)) - ((\text{g/kg Cl}/0,0035) + (\text{g/kg S}/0,00321) (\times 2))$$

Los coeficientes de digestibilidad de la MS, MO, FND, FAD y N fueron calculados como (g ingeridos – g heces)/g ingeridos.

A partir de cada pool de orina se analizaron los contenidos de Na, N y derivados de purina. El Na fue medido por espectrofotometría de absorción atómica (Varian Spectraa 55b, Palo Alto, CA, USA) según Perkin Elmer (1998). Se calculó el N retenido (g) por animal y por día como N ingerido (g/d) – (N eliminado en heces (g/d) + N eliminado por orina (g/d)). Los derivados de purina en orina (**DP**: alantoína, ácido úrico, xantina e hipoxantina) fueron cuantificados en cada pool de orina de acuerdo a Balcells et al. (1992) mediante cromatografía líquida de alta performance (HPLC, Dionex Ultimate® 3000) usando una columna Acclaim, C18, 5 µm, 4,6 x 250 mm y a 205 nm. La síntesis de N microbiano ruminal (**SNM**) fue estimada a partir de los DP totales eliminados en la orina de acuerdo a la ecuación propuesta por Puchala & Kulasek (1992):

$$Y = \exp(0,747 + 1,817 X),$$

donde: Y es el flujo duodenal de N microbiano (g/d) y X es la excreción urinaria de N de derivados de purina totales (**NDP**, g/d). La eficiencia de SNM ruminal fue expresada como g/ MO aparentemente digestible ingerida (**MODI**, kg), obtenida a partir de los valores de digestibilidad.

Las concentraciones de cromo en heces fueron analizadas de acuerdo a Czarnocki et al. (1961). Los parámetros de la cinética de pasaje fueron estimados mediante el análisis individual de las curvas de excreción fecal de cromo de acuerdo a dos modelos matemáticos, uno propuesto por Dhanoa et al. (1985) y otro propuesto por Grovum & Williams (1973), pero se presentan los datos del modelo de mejor ajuste, en este caso el modelo propuesto por Dhanoa et al. (1985):

$$Y = Ae^{-k_1(t-TT)} \exp(-Be^{-k_2(t-TT)}),$$

donde: Y es la concentración del marcador al tiempo t (h), Ae es un parámetro de escala dependiente de k1, **k1** es la tasa de salida del rumen (h<sup>-1</sup>), **k2** es la tasa de salida del ciego-colon (h<sup>-1</sup>), Be es el número de compartimentos (2 en este caso, rumen y ciego-colon) y **TT** es el tiempo de tránsito (pasaje de la digesta a través del sector posterior al rumen; h). El tiempo medio total de retención (**TMTR**, h) fue calculado como: (1/k1) + (1/k2) + TT.

La concentración de N-NH<sub>3</sub> en las muestras se analizó por destilación directa (FAO, 1986).

Para la evaluación de la actividad fermentativa del inóculo ruminal, se incubaron muestras de paja de trigo (873 g/kg MS, 457 g/kg FAD, 563 g/kg PB; en base a MS) en frascos de 125 mL tapados con septa de goma y precinto de metal, en un baño maría a 39 °C según la técnica descrita por Mauricio et al. (1999). Los frascos contuvieron 40,5 mL de una solución de incubación conteniendo sulfuro de sodio como agente reductor (Williams et al., 2005). El inóculo ruminal de cada tratamiento fue incluido a una

proporción final de 0,25 del volumen total de incubación (es decir, 10 mL de inóculo ruminal / frasco). Todos los ingredientes fueron mezclados bajo un flujo de CO<sub>2</sub>. Se realizó una incubación de 96 h consecutivas, con 3 frascos con inóculo y 2 blancos (es decir, frascos sin sustrato para corregir la producción de gas) para cada inóculo (frascos totales = 10). La presión interna de los frascos fue registrada a 2, 4, 6, 8, 10, 12, 18, 24, 48, 72 y 96 h con un manómetro D1005PS (Ashcroft®, Stratford State, USA) y una aguja hipodérmica. Luego de cada lectura se procedió a la liberación del gas. Las lecturas de presión fueron convertidas a volumen utilizando la ecuación obtenida en experimentos previos realizados en condiciones similares como:

$$V = 4,40 P + 0,09 P^2,$$

donde: V es el volumen de gas en mL y P es la presión observada en psi ( $R^2=0,998$ ). El volumen de gas acumulado para cada tiempo de incubación hasta la hora 96 fue expresado como mL/ MS incubada (MSi, g).

### 6.1.1.3. Análisis estadístico:

Los datos fueron analizados utilizando el procedimiento mixto de SAS (versión 8.2; SAS Institute, Cary, NC, USA). Para el comportamiento ingestivo, consumo, digestibilidad, cinética de pasaje, retención de N, SNM y eficiencia de SNM se utilizó el modelo:

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

donde:  $Y_{ijk}$  fue la variable dependiente,  $\mu$  la media general,  $T_i$  el efecto fijo del tratamiento ( $i = \text{Control o Buffer}$ ) en  $k$  repeticiones del animal ( $n = 6$  borregos),  $B_j$  el efecto aleatorio del bloque ( $j = 6$  bloques), y  $e_{ijk}$  el error residual.

Los datos del consumo de agua no presentaron una distribución normal por lo que los mismos fueron normalizados mediante la transformación a  $\log_{10}$  para su posterior análisis mediante el modelo descrito anteriormente.

El pH y el N-NH<sub>3</sub> fueron analizados como medidas repetidas sobre el borrego de acuerdo al modelo:

$$Y_{ijkl} = \mu + T_i + B_j + H_k + (TxH)_{ik} + e_{ijkl},$$

donde:  $Y_{ijkl}$  fue la variable dependiente,  $\mu$  la media general,  $T_i$  el efecto fijo del tratamiento ( $i = \text{Control o Buffer}$ ) en  $l$  repeticiones del animal ( $n = 4$  borregos),  $B_j$  el efecto aleatorio del bloque ( $j = 6$  bloques),  $H_k$  el efecto fijo de la hora ( $k = 1$  a 24 horas),  $(TxH)_{ik}$  la interacción entre tratamiento y hora y  $e_{ijkl}$  el error residual.

El volumen de gas acumulado fue comparado entre inóculos como medidas repetidas en el frasco utilizando el modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + I_i + H_j + (IxH)_{ij} + e_{ijk},$$

donde:  $Y_{ijk}$  fue la variable dependiente,  $\mu$  fue la media general,  $I_i$  el efecto fijo del inóculo ( $i = \text{Control o Buffer}$ ) en  $k$  repeticiones de frasco ( $n = 3$  frascos),  $H_j$  el efecto fijo de la hora ( $k = 2, 4, 6, 8, 10, 12, 18, 24, 48, 72$  o 96 horas),  $(IxH)_{ij}$  la interacción entre inóculo y hora, y  $e_{ijk}$  el error residual.

Se declararon como diferencias significativas a valores de  $P \leq 0,05$  y valores de P entre 0,05 y 0,10 fueron considerados como tendencias a diferencias.

## 6.1.2. Experimento Ib

### 6.1.2.1. Mediciones:

El primer día de mediciones (Fig. 2), se extrajeron muestras del contenido ruminal (líquido + sólido), a partir del fondo del saco ventral del rumen mediante la sonda ruminal en 3 animales de cada tratamiento (3 bloques de PV). Se realizaron 2 estudios diferentes de recuentos bacterianos mediante la técnica de FISH (*Fluorescence in situ hybridation*):

*Estudio 1:* evaluación de la microbiota ruminal de los animales sometidos a los distintos esquemas de alimentación. Para esto se extrajeron muestras de contenido ruminal a las 4 horas luego del inicio de la ingesta en ambos grupos (24h y 6h). Dicho horario de muestreo se seleccionó en base a los resultados de pH ruminal obtenidos en otra parte del mismo experimento que no corresponde a esta Tesis (Pérez-Ruchel et al., 2013); la hora 4 fue la hora con menor pH, indicando una mayor actividad microbiana.

*Estudio 2:* evolución de la microbiota ruminal en animales con acceso restringido al forraje. Para esto se extrajeron muestras solamente de los animales del tratamiento 6h, a 0, 4 y 8 horas luego del inicio de la ingesta.

### 6.1.2.2. Análisis químicos, determinaciones y cálculos:

Inmediatamente luego de extraídas las muestras, se midió el pH del contenido ruminal con un pHmetro (eChem Instruments Pte. Ltd., Oakton, Singapur). El contenido ruminal presentó un porcentaje de MO de 82,6 % (determinado a 520 °C durante 3 h), 10 mL de contenido ruminal fueron mezclados con 10 mL de buffer salino fosfatado (PBS) suplementado con 0,025 g/L de Na<sub>2</sub>-Cisteína (PBS-Cys). Inmediatamente, la suspensión resultante se procesó en un homogeneizador Stomacher 80 LabBlender (Seward, UK) durante 60 segundos a máxima velocidad. Estos procedimientos fueron realizados para disgregar la fase sólida y con el fin de mantener las condiciones reductoras y anaerobias de la muestra. Las muestras fueron fijadas en etanol absoluto (1:1) a 4 °C por 24 h y luego almacenadas a -20 °C hasta su utilización. Posteriormente las muestras fijadas fueron diluidas y se filtraron utilizando filtros ISOPORE de 0,2 µm (MILLIPORE, Irlanda) que se almacenaron a -20°C hasta su utilización. Posteriormente se permeabilizaron las células bacterianas fijadas para facilitar el ingreso de las sondas. Para ello los filtros se incubaron con lizozima (10 mg/mL), a 37 °C durante 1 hora, y luego con proteinasa k (0,09 u/mL) en buffer TE (10 x), a 37 °C durante 15 minutos.

Las hibridaciones fueron realizadas sobre los segmentos de filtro según Pernthaler et al., (2003). Las sondas dirigidas al ARNr16S bacteriano así como el porcentaje de formamida utilizado se presentan el Cuadro I y han sido previamente utilizadas (Fraga et al., 2013). Se utilizó una mezcla equimolar de 3 sondas para la detección de miembros del Dominio *Bacteria* (Amann et al., 1990; Daims et al., 1999). Las sondas estuvieron dirigidas a detectar grupos y especies bacterianas tradicionalmente asociadas a miembros de la microbiota ruminal con diferentes funciones. Se utilizaron sondas de oligonucleótidos específicas dirigidas a bacterias fibrolíticas: *Ruminococcus albus* y *Ruminococcus flavefaciens*, consumidoras de lactato: *Selenomonas ruminatum*, *Propionibacterium* spp., *Megaesphaera eldesnii*, y una sonda para detectar *Streptococcus* spp., dada su relevancia en la acidosis de rumiantes. Para cada filtro, se

contaron aproximadamente 1000 células totales (marcadas con DAPI: fluorocromo que tiñe todo el ADN de forma inespecífica). En esa cantidad de células totales se hizo el recuento de bacterias representantes de los diferentes grupos evaluados y de bacterias totales (detectados con la mezcla de sondas para Bacteria), luego conociendo la cantidad de campos en los que se hizo el recuento (superficie), la cantidad de muestra y dilución utilizada, se calculó el número total de cada grupo por mL de contenido ruminal.

**Cuadro I.** Sondas de oligonucleótidos utilizadas para la técnica de *Fluorescence in situ hybridization* (FISH)

Sonda	Secuencia de la sonda (5' - 3') <sup>a</sup>	% Formamida
<i>Selenomonas ruminantium</i>	CCCATCTTTGCGGCAGGTTG	40
<i>Megasphaera elsdenii</i>	ACCCGTTTGCCACTCGAATC	30
<i>Ruminococcus albus</i>	TGCGGTTAGAACACAGGC	30
<i>Propionibacterium</i> spp.	AATTCCATTCTCCCCTACCTTC	50
<i>Streptococcus</i> spp.	GTAGGCAGGTTACCTACGCG	50
<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	CCCTCTCTCTAAGGTAGG	10
Eubacteria	GCTGCCTCCCGTAGGAGT GCAGCCACCCGTAGGTGT GCTGCCACCCGTAGGTGT	35

<sup>a</sup> Sondas marcadas con FITC en el extremo 5' (Fraga et al., 2013).

### 6.1.2.3. Análisis estadístico:

Se analizó la normalidad en las variables evaluadas mediante Proc. Univariate del SAS<sup>®</sup> (SAS Institute, Cary, USA, 2000). Los recuentos de microorganismos no presentaron una distribución normal por lo que los datos fueron normalizados mediante la transformación a log<sub>10</sub> para su posterior análisis mediante el Proc. Mixed del SAS<sup>®</sup>.

Los grupos bacterianos y los valores de pH ruminal se compararon entre animales sometidos a cada uno de los 2 tratamientos de alimentación (24h vs. 6h, *Estudio 1*), utilizando el modelo:

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

donde:  $Y_{ijk}$  es la variable dependiente,  $\mu$  es la media general,  $T_i$  es el efecto fijo del tratamiento (24h vs. 6h) en  $k$  réplicas animales ( $n = 3$  borregos),  $B_j$  es el efecto aleatorio del bloque ( $j = 3$  bloques) y  $e_{ijk}$  es el error residual.

Los recuentos de diferentes grupos bacterianos ruminales, y los valores de pH ruminal entre animales con acceso restringido al forraje a diferentes horarios luego del comienzo de la ingesta (*Estudio 2*) se analizaron como medidas repetidas sobre el animal de acuerdo al modelo:

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

donde:  $Y_{ijk}$  es la variable dependiente,  $\mu$  es la media general,  $H_i$  el efecto fijo hora (h 0, 4 y 8) en  $k$  réplicas animales ( $n = 3$  borregos),  $B_j$  es el efecto aleatorio del bloque ( $j = 3$  bloques), y  $e_{ijk}$  es el error residual.

Las medias de los datos de los diferentes horarios (h0, h4 y h8) fueron comparados mediante el test de Tukey. Se aceptaron como diferencias significativas valores de  $P \leq 0,05$  y como tendencia a diferencias, a valores de  $P$  mayores a  $0,05$  y menores a  $0,1$ .

## 6.2. EXPERIMENTO II

El Experimento II se llevó a cabo en el Campo Experimental de Libertad (latitud:  $34^{\circ}40.65'S$ , longitud  $56^{\circ}32.35'O$ ) y en el laboratorio de Nutrición Animal de la Facultad de Veterinaria.

### *Animales, dietas y diseño experimental*

Veinticuatro corderos Corriedale x Milchschaf (edad: 4 meses), con PV promedio de  $25,2 \pm 3,67$  kg y fistulizados en rumen, fueron alojados individualmente en jaulas de metabolismo. Los corderos fueron bloqueados por PV (6 bloques) y asignados al azar a uno de los siguientes tratamientos: **RTM100**= RTM ofrecida *ad libitum* durante todo el día; **RTM75**= RTM a un nivel de 0,75 del consumo potencial complementado con forraje fresco; **RTM50**= RTM a un nivel de 0,50 del consumo potencial complementado con forraje fresco; **RTM0**= forraje fresco *ad libitum* durante todo el día. El experimento consistió en 21 días de adaptación a las condiciones experimentales y un período de mediciones de 22 días. Para todos los tratamientos, la RTM fue preparada diariamente y ofrecida a las 9:00 h. El nivel de RTM para RTM75 y RTM50 se fijó de acuerdo al consumo potencial, y fue provisto en una sola comida. El consumo potencial fue estimado mediante la medición del consumo voluntario de los alimentos correspondientes (RTM y/o forraje fresco) durante un período previo de 15 días. El forraje provenía de una pastura que fue cortada diariamente, y ofrecido fresco en cantidades ilimitadas, luego que los animales acabaran el consumo de RTM. Los animales tuvieron libre acceso al agua de bebida.

La RTM (Cuadro II) fue formulada para obtener ganancias diarias de 300 gramos por día de acuerdo a las regulaciones del NRC (2007), y contenía 350 g/kg MS de harina de soja peleteada, 321 g/kg MS de grano de maíz seco partido, 300 g/kg MS de ensilado de planta entera de maíz, 12 g/kg de bicarbonato de sodio (0,99 de pureza), 10 g/kg MS de carbonato de calcio (0,985 de pureza), 5 g/kg MS de cloruro de amonio (0,996 de pureza) y 2 g/kg MS de una mezcla de sales y vitaminas (hierro, cobre, magnesio, manganeso, calcio, fósforo, zinc, cloruro de sodio, vitaminas A, D3, E, B1, B2, B6, B12, nicotinamida y pantotenato de calcio).

El forraje (Cuadro II) fue colectado de una parcela con plantas en estado vegetativo y una disponibilidad inicial de 1475 kg MS/ha, compuesta principalmente por alfalfa (composición botánica: 792 g/kg MS de alfalfa (*Medicago sativa*), 156 g/kg MS de *Lolium multiflorum*, 10 g/kg MS de *Lotus corniculatus* y 42 g/kg MS de forraje muerto y hiervas. La misma fue cortada diariamente a las 13:00 h con una segadora de disco (5 cm altura desde el suelo) y ofrecida fresca desde las 14:00 h.

Como se mencionó anteriormente, los datos de este experimento serán publicados en 2 artículos. El primero (Experimento IIa) abarca la evaluación del consumo, aprovechamiento digestivo de la dieta y ambiente ruminal y, el segundo (Experimento IIb) abarca el estudio de la actividad fermentativa ruminal mediante la técnica de

producción de gas *in vitro*, de corderos en crecimiento alimentados con diferentes combinaciones de RTM y forraje fresco.

**Cuadro II.** Composición química de las dietas y alimentos experimentales (valores medios)

	Dietas		Ingredientes aislados		
	Forraje*	RTM*	Harina de soja**	Maíz partido**	Ensilado de planta entera de maíz**
MS, g/kg MF <sup>a</sup>	296	401	889	890	156
g/kg MS					
MO <sup>b</sup>	905	940	940	984	915
aFNDmo <sup>c</sup>	374	354	211	120	640
FADmo <sup>d</sup>	211	172	75,9	320	344
Lignina (as) <sup>e</sup>	53,5	18,1	---	---	---
PB <sup>f</sup>	209	198	460	136	81,1
CNE <sup>g</sup>	305	363	256	699	172
CHS <sup>h</sup>	96,8	65,2	---	---	---
EE <sup>i</sup>	16,5	25,3	13,1	29,1	21,6
g/kg N					
NIDN <sup>j</sup>	235	148	---	---	---
NIDA <sup>k</sup>	130	94,9	---	---	---
Mcal/kg MS					
EM <sup>l</sup>	2,36	2,41	2,69	2,87	1,84

<sup>a</sup> Materia seca, g/kg de materia fresca; <sup>b</sup> materia orgánica; <sup>c</sup> fibra neutro detergente analizada utilizando alfa amilasa termo estable y sulfato de sodio y corregida por blancos y expresada sin cenizas residuales; <sup>d</sup> fibra ácido detergente corregida por blancos y expresada sin cenizas residuales; <sup>e</sup> lignina insoluble en ácido sulfúrico; <sup>f</sup> proteína bruta; <sup>g</sup> carbohidratos no estructurales; <sup>h</sup> carbohidratos solubles en agua; <sup>i</sup> extracto etéreo; <sup>j</sup> nitrógeno insoluble en detergente neutro; <sup>k</sup> nitrógeno insoluble en detergente ácido; <sup>l</sup> energía metabolizable. \* n=10 (promedio a partir de muestras analizadas durante el período de mediciones); \*\* n=2 (promedio a partir de muestras analizadas al inicio del experimento).

### 6.2.1. Experimento IIa

#### 6.2.1.1. Mediciones:

El consumo diario de RTM y forraje fresco fue medido durante los días 1 a 10 del período de mediciones (Fig. 2) pesando las cantidades ofrecidas y rechazadas. Se colectaron diariamente muestras de los alimentos ofrecidos y rechazados (cuando los mismos excedieron los 0,20 respecto a la cantidad ofrecida), que fueron secadas en una estufa de aire forzado a 60 °C y molidas a un tamaño de malla de 1 mm.

El comportamiento ingestivo fue individualmente evaluado mediante observación directa el día 2 (Fig. 2), utilizando la técnica de observación en un intervalo regular de 5 min durante 24 h (Galvani et al., 2010). Cuatro observadores entrenados categorizaron el comportamiento de los animales como ingestión (búsqueda de alimentos, prehensión,

masticación), rumia (masticación del bolo regurgitado de alimento) y descanso (cuando los animales no mostraban ninguna de las otras 2 actividades). La duración de cada actividad (minutos totales) fue calculada como el número de observaciones multiplicado por 5. Adicionalmente, el tiempo de ingestión, rumia y descanso por kg de MS y de fibra neutro detergente (**aFNDmo**) ingerida, fue calculada como tiempo de cada actividad / kg de MS o aFNDmo ingerida.

Para la medición de la tasa de ingestión se muestrearon la RTM y el forraje a cada hora durante 12 h desde el inicio de la ingesta de RTM (9:00 h, día 11 – Fig. 2), se secaron en estufa de aire forzado a 60 °C y se calculó la cantidad de MS de cada alimento ingerida por hora.

La digestibilidad aparente fue medida mediante el pesado de la excreción fecal diaria e individual desde el día 2 al 7 (Fig. 2). Se colectaron muestras de heces de cada cordero, se secaron en estufa de aire forzado a 60 °C, se molieron a un tamaño de malla de 1 mm y se confeccionó una muestra compuesta (“pool”) por cada animal para su posterior análisis.

La estimación de la tasa de pasaje de la fracción particulada de la digesta a través del tracto gastro-intestinal fue realizada utilizando FCM como marcador, preparada de acuerdo a Udén et al. (1980). La FCM fue administrada en forma oral a cada cordero (día 12, Fig. 2), en una sola dosis de 20 g. Se colectaron muestras de heces directamente del recto a las horas 0, 12, 24, 30, 34, 38, 42, 48, 60, 72, 96 y 120 a partir de la administración de FCM, las mismas fueron secadas en estufa de aire forzado a 55 °C, molidas a 1 mm de malla y almacenadas para su posterior análisis.

Se extrajeron muestras de líquido ruminal hora a hora desde las 9:00 a las 21:00 h y también a la hora 01:00 y 05:00, durante el día 17 (Fig. 2). El pH ruminal fue medido inmediatamente utilizando un pH metro digital (eChem Instruments Pte., Oakton, Singapur). Dos muestras de cada extracción (1 mL) fueron mezcladas con 0,02 mL de ácido sulfúrico (50%, v/v) y con 1 mL de ácido perclórico (0,1 M), respectivamente, y se almacenaron para la posterior determinación de las concentraciones de N-NH<sub>3</sub> y AGV, respectivamente.

#### 6.2.1.2. Análisis químicos y cálculos:

Las muestras de alimentos (ofrecidos y rechazados) y los pools fecales fueron analizados para MS, MO y N de acuerdo al AOAC (1990, métodos ID 934.01, ID 942.05 e ID 984.13, respectivamente), aFNDmo y fibra ácido detergente (**FADmo**) de acuerdo a Robertson & Van Soest (1981), utilizando un analizador de fibras Tecnal (TE- 149, Tecnal, Piracicaba, SP, Brasil), expresadas sin cenizas residuales y corregidas por blancos como fue sugerido por Mertens (2003). La aFNDmo fue analizada utilizando sulfito de sodio y amilasa. Los coeficientes de digestibilidad de la MS, MO, aFNDmo, FADmo y N fueron calculados como (g ingeridos - g excretados)/ g ingeridos. En las muestras de los alimentos también se analizó el contenido de lignina (as) (AOAC, 1990, método ID 973.18), el contenido de N insoluble en detergentes neutro y ácido (**NIDN - NIDA**, de acuerdo a Licitra et al. (1996), expresado en relación al contenido de N total), el contenido de extracto etéreo (**EE**) según Nielsen (2003), utilizando un extractor de grasa (Goldfish, Labconco 35001, Texas, USA) con un reflujo de éter de petróleo a 180 °C durante 3 h), y el contenido de CHS (Yemm &

Willis, 1954). Además, se calcularon los contenidos de CNE y de energía de los alimentos. Los CNE se calcularon según Sniffen et al. (1992) como:

$$100 - (aFND_{mo}, g/100 g + \text{proteína bruta (PB), } g/100 g + EE, g/100 g + \text{ cenizas, } g/100 g).$$

El contenido de energía digestible (**ED**) y metabolizable (**EM**) expresado en Mcal/kgMS se estimó utilizando las ecuaciones propuestas por Fomnesbeck et al. (1981,  $ED = 3,76 - (0,024 \times FND)$ ) y por Garrett et al. (1959,  $EM = ED \times 0,827$ ), respectivamente.

La concentración de cromo en las heces fue analizada de acuerdo a Czarnocki et al. (1961) y la cinética de pasaje de las partículas fue estimada mediante el análisis individual de las curvas de excreción fecal de cromo de acuerdo a dos modelos matemáticos, uno propuesto por Dhanoa et al. (1985) y otro propuesto por Grovum & Williams (1973), pero se presentan los datos del modelo de mejor ajuste, en este caso el modelo propuesto por Grovum y Williams (1973):

$$Y = A * e^{-k_1*(t-TT)} - A * e^{-k_2*(t-TT)},$$

donde Y es la concentración de marcador al tiempo t (h), A es la concentración del marcador ajustada a la MS fecal,  $k_1$  y  $k_2$  ( $h^{-1}$ ) son las tasas de salida desde el rumen y ciego-colon, respectivamente, y TT fue un tiempo calculado hasta la primera aparición del marcador en las heces (tiempo de tránsito). El tiempo medio de retención en ambos compartimentos (**TMR**, h) fue calculado como  $(1/k_1 + 1/k_2)$  y el tiempo medio de retención total (TMRT, h) como  $TMR + TT$ .

La concentración de N-NH<sub>3</sub> de las muestras de líquido ruminal fue analizada por espectrofotometría de acuerdo a Weatherburn (1967), utilizando un espectrofotómetro (BEL Photonics®, S-2000, SP, Brasil) y las concentraciones de AGV [ácidos acético (**A**), propiónico (**P**) y butírico (**b**)] fueron analizadas por cromatografía de acuerdo a Adams et al. (1984) utilizando un HPLC (Dionex Ultimate® 3000, Waltham, Massachusetts, USA) y una columna Acclaim Rezex Organic Acid H<sup>+</sup> (8%), 7,8 x 300 mm y 210 nm. Las concentraciones de AGV fueron expresadas en términos absolutos (mM) y como % en relación a la concentración de AGV totales. La concentración de AGV totales se calculó como la suma de las concentraciones de A, P y B.

### 6.2.1.3. Análisis estadístico:

Los datos fueron analizados mediante el procedimiento mixto de SAS (versión 8.2; SAS Institute, Cary, NC, USA). Para el comportamiento ingestivo, consumo, digestibilidad y cinéticas de pasaje se utilizó el modelo:

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

donde  $Y_{ijk}$  fue la variable dependiente,  $\mu$  fue la media general,  $T_i$  el efecto fijo del tratamiento ( $i = \text{RTM100, RTM75, RTM50 o RTM0}$ ) en  $k$  repeticiones de animal ( $n = 6$  corderos),  $B_j$  el efecto aleatorio del bloque ( $j = 6$  bloques) y  $e_{ijk}$  el error residual.

La tasa de ingestión, pH y las concentraciones de AGV y N-NH<sub>3</sub> fueron analizadas como medidas repetidas en el cordero como sujeto de las medidas repetidas, de acuerdo al modelo:

$$Y_{ijkl} = \mu + T_i + B_j + t_k + (T \times t)_{ik} + e_{ijkl},$$

donde  $Y_{ijkl}$  fue la variable dependiente,  $\mu$  fue la media general,  $T_i$  el efecto fijo del tratamiento ( $i = \text{RTM100, RTM75, RTM50 o RTM0}$ ) en  $l$  repeticiones de animal ( $n = 6$  corderos),  $B_j$  el efecto aleatorio del bloque ( $j = 6$  bloques),  $t_k$  el efecto fijo del tiempo ( $k$

= 9:00, 10:00, 11:00, 12:00, 13:00, 14:00, 15:00, 16:00, 17:00, 18:00, 19:00, 20:00, 21:00, 01:00 y 05:00 h),  $(T \times t)_{ik}$  la interacción entre tratamiento y hora, and  $e_{ijkl}$  el error residual. Adicionalmente, los valores medios de la tasa de consumo fueron separados mediante test de Tukey y los datos espaciados de manera desigual (pH y concentraciones de AGV y N-NH<sub>3</sub>) fueron analizados con la orden de potencia espacial (SP (POW)) como la estructura de covarianza.

El efecto de los niveles decrecientes de RTM en la dieta (1,0; 0,75; 0,50 y 0,0) sobre los valores promedio fue evaluado mediante regresiones lineal y cuadrática.

Se declararon como diferencias significativas a valores de  $P \leq 0,05$  y los valores de P entre 0,05 y 0,10 fueron considerados como tendencias a diferencias.

## 6.2.2. Experimento IIb

### 6.2.2.1. Mediciones:

El día 18 de mediciones (Fig. 2) se colectó líquido ruminal de cada animal a la hora 2 en relación al inicio de la ingesta de RTM, y se utilizó individualmente como inóculo para evaluar su actividad fermentativa *in vitro*.

### 6.2.2.2. Análisis químicos y cálculos:

Para el estudio de la actividad fermentativa ruminal se utilizaron muestras de ensilado de maíz, grano de maíz y forraje (ver su composición química en el Cuadro II) como sustratos. Estas muestras fueron pesadas e introducidas en frascos de 125 mL (1 frasco/sustrato/animal + 2 blancos/animal, total= 120 frascos), los cuales fueron llenados con 40,5 mL de una solución basal (Williams et al., 2005) y 10 mL de líquido ruminal filtrado, tapados con septa de goma, sellados con precinto metálico e incubados en un baño María a 39 °C durante 96 h, de acuerdo a la técnica descrita por Mauricio et al. (1999). Todos los procedimientos de incubación fueron realizados bajo una corriente de CO<sub>2</sub>. La presión interna de los frascos fue registrada a las 2, 4, 6, 8, 10, 12, 18, 24, 48, 72 y 96 h desde el inicio de la incubación con un manómetro D1005PS (Ashcroft®, Stratford, USA) y una aguja hipodérmica. Luego de cada lectura el gas fue expulsado. Se calculó la producción de gas acumulada, a partir de los valores de presión, según el modelo:

$$\text{Gas} = a + b \{ 1 - \exp[-kd(t - \text{lag})] \},$$

donde: **a+b** (mL) es la producción de gas potencial, **kd** (h<sup>-1</sup>) es la tasa de producción de gas, y **lag** (h) es el tiempo de latencia.

### 6.2.2.3. Análisis estadístico:

Los datos fueron analizados mediante el procedimiento mixto de SAS (versión 8.2; SAS Institute, Cary, NC, USA).

Los inóculos ruminales fueron comparados como medidas repetidas en el frasco utilizando el modelo:

$$Y_{ij} = \mu + I_i + S_j + (I \times S)_{ij} + e_{ij},$$

donde  $Y_{ijk}$  fue la variable dependiente,  $\mu$  fue la media general,  $I_i$  el efecto fijo del inóculo ( $i = \text{RTM100, RTM75, RTM50 o RTM0}$ ),  $S_j$  el efecto fijo del sustrato ( $j = \text{ensilado de planta de maíz, grano de maíz, o forraje}$ ), y  $(I \times S)_{ij}$  la interacción entre inóculo y sustrato, y  $e_{ij}$  el error residual.

El efecto de los niveles decrecientes de RTM en la dieta (1,0; 0,75; 0,50 y 0,0) sobre los valores promedio fue evaluado mediante regresiones lineal y cuadrática.

Se declararon como diferencias significativas a valores de  $P \leq 0,05$  y los valores de  $P$  entre 0,05 y 0,10 fueron considerados como tendencias a diferencias. Los valores promedio por tratamiento fueron comparados por test de Tukey cuando resultó de interés.

### 6.3. EXPERIMENTO III

El estudio fue realizado en el Departamento de Zootecnia de la Universidad Federal de Santa María, Campus Camobi, Santa María, RS, Brasil (latitud: 29°45'S, longitud: 53°42'O).

#### *Animales, dietas y diseño experimental*

Se utilizaron 3 ovinos Santa Inés adultos, machos y castrados ( $69,4 \pm 0,4$  kg PV), con cánula ruminal, fueron alojados en jaulas metabólicas individuales. El experimento consistió en un diseño de cuadrado latino 3x3, con períodos de 10 días de adaptación y 3 de mediciones (Fig. 2). Los animales fueron asignados a los siguientes tratamientos: **RTM**= 100% de ración totalmente mezclada), **Forraje**= 100% de forraje, o **RTM+F**= 50% de RTM y 50% de forraje (Dieta mixta). El forraje consistió en una mezcla de forraje fresco de una pastura y fardo. El forraje fresco provenía de una pastura templada de avena (*Avena strigosa*) y ryegrass (*Lolium multiflorum*), que fue cortada a 5 cm del suelo, en estado vegetativo temprano, al inicio del experimento, y mantenida en una cámara a -18°C durante todo el experimento. El fardo, que estaba constituido por Tifton 85 (*Cynodon spp.*), fue picado a un tamaño de partícula de unos 6 cm y mezclado cada día con el forraje fresco en una proporción de 70:30 (en base seca), de forraje fresco y fardo respectivamente. Esta mezcla se realizó debido a los problemas de acidosis detectados al inicio del experimento al administrar.

La ración totalmente mezclada estuvo compuesta por: 350 g/kg MS de harina de soja, 321 g/kg MS de grano de maíz partido, 300 g/kg MS de ensilado de planta entera de maíz, 12 g/kg de bicarbonato de sodio (0,99 de pureza) y 17 g/kg de una mezcla de sales y vitaminas (calcio, cobalto, cobre, azufre, hierro, fósforo, flúor, zinc, iodo, magnesio, manganeso, selenio, sodio y vitaminas A, D3 y E). Los alimentos (RTM o forraje) fueron ofrecidos a un nivel de consumo voluntario (ajustando cada día la oferta de alimento considerando el rechazo de los 3 días anteriores). Para el tratamiento RTM+F los animales recibieron primero el forraje (08:00 a 16:00 h) y luego que acababan el mismo se les ofrecía la RTM (16:00 a 08:00h), en forma separada. En el Cuadro III se presenta la composición química de cada uno de los principales ingredientes de la RTM, de la RTM y del forraje (pastura+fardo).

**Cuadro III.** Composición química de las dietas y alimentos experimentales (valores medios)

	Dietas		Ingredientes aislados				
	Forraje <sup>a*</sup>	RTM*	Pastura <sup>b**</sup>	Fardo <sup>c***</sup>	Harina de soja <sup>***</sup>	Maíz partido <sup>***</sup>	Ensilado de planta entera de maíz <sup>**</sup>
MS, g/kg MF <sup>d</sup>	238	638	222	996	985	985	360
<i>g/kg MS</i>							
MO <sup>e</sup>	841	916	865	892	931	975	941
PB <sup>f</sup>	236	204	223	113	501	101	78
FND <sup>g</sup>	513	302	470	736	282	200	523
FAD <sup>h</sup>	248	117	239	359	101	240	287

<sup>a</sup> forraje fresco de pastura (avena+ryegrass) mezclada con fardo picado (70:30, en base seca); <sup>b</sup> pastura (avena+ryegrass); <sup>c</sup> fardo de Tifton 85 (*Cynodon spp.*) picado; <sup>d</sup> materia seca, g/kg de materia fresca; <sup>e</sup> materia orgánica; <sup>f</sup> proteína bruta; <sup>g</sup> fibra neutro detergente; <sup>h</sup> fibra ácido detergente. \* n=20; \*\* n=2; \*\*\* n=1

### 6.3.1. Mediciones y muestreos

En la Fig. 3 se puede observar el esquema de mediciones realizadas. Para evaluar la MS desaparecida en 24 h (**MSD**), el grado de adherencia de las bacterias ruminales a las partículas de alimento, y la actividad fibrolítica de las bacterias adheridas a las partículas, se incubaron en el rumen de cada animal, los alimentos fibrosos que componían la dieta de los animales, es decir, en aquellos animales que recibían solo forraje en la dieta, el sustrato incubado fue el mismo forraje utilizado en el experimento (pastura+fardo), para los animales alimentados con RTM el sustrato incubado fue el ensilado de planta entera de maíz que se incluía en la RTM, y, en aquellos animales que recibían RTM+F, se incubaron ambos sustratos, el forraje utilizado en el experimento y el ensilado de maíz que componía la RTM. Se incubaron 15 bolsas de cada sustrato (forraje o ensilado de planta entera de maíz) según el tratamiento (Fig. 3). Aproximadamente 1 g de muestra seca y molida de cada sustrato fue pesado en una bolsa de polyester (5 × 5 cm, porosidad de 50 µ), las cuales fueron selladas e incubadas en el rumen de los animales (*in situ*) durante 24 h.

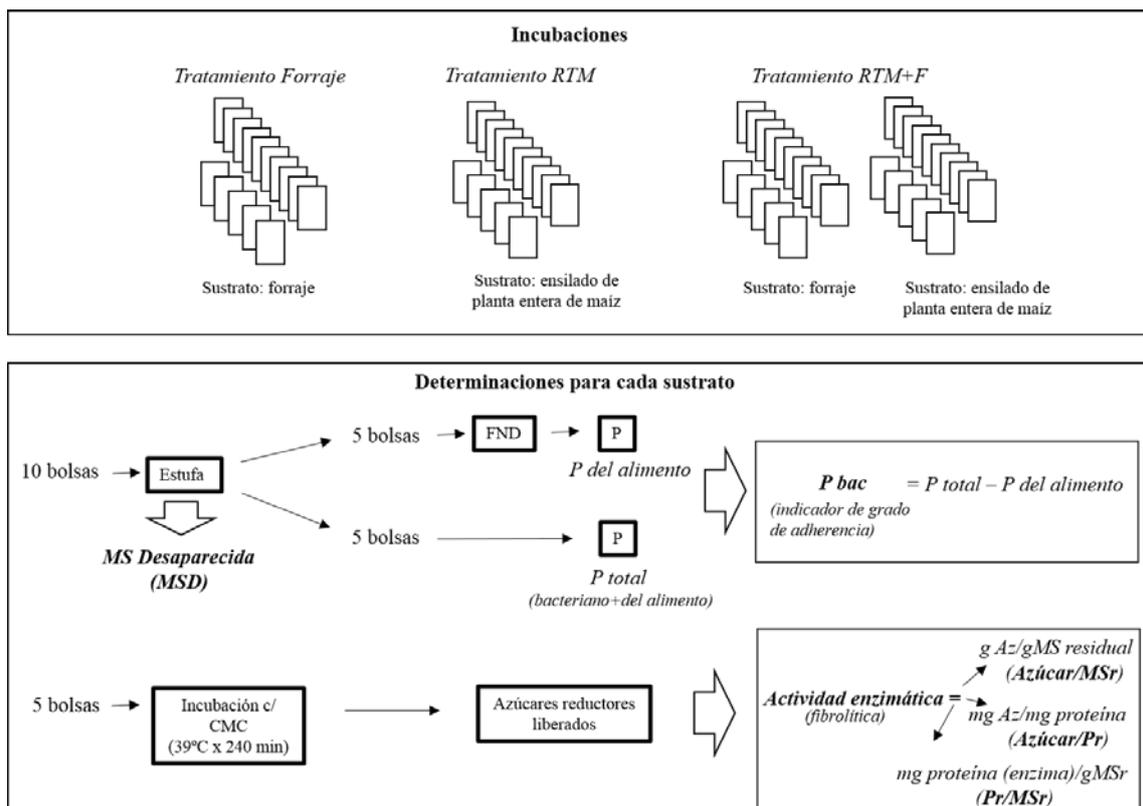
Para evaluar la MSD *in situ* y la adherencia de los microorganismos a las partículas, luego de 24 h de incubación en el rumen, 10 bolsas conteniendo el residuo de cada sustrato, fueron lavadas con agua corriente y sumergidas en una solución de NaCl (9 g/L) durante 5 min para extraer las bacterias no-adheridas, se lavaron nuevamente con agua destilada, se secaron en estufa de aire forzado a 55 °C y se pesaron para determinar la MSD (Fig. 3). De esas 10 bolsas, 5 fueron tratadas con una solución neutro detergente (igual que para la determinación de FND, ver la sección de análisis químicos de alimentos ofrecidos y rechazados) y se les determinó el contenido de fósforo (determinación de P remanente en la FND, P del alimento). A las otras 5 bolsas, luego de secado se les determinó el contenido de P directamente (P total = bacteriano + del alimento). La concentración de P fue analizada utilizando un método colorimétrico adaptado de Fiske & Subbarov (1925) tal como fue descrito previamente por Farenzena

et al. (2013). Se calculó la adherencia microbiana como la diferencia entre el contenido de P total menos el contenido de P en la FND residual.

Para determinar la actividad enzimática bacteriana (carboximetilcelulasa (CMCasa)), se utilizaron 5 de las 15 bolsas que se incubaron en rumen por sustrato (Fig. 3). Se siguió el procedimiento descrito por Farenzena et al. (2013) para obtener un extracto enzimático de las bacterias adheridas a las partículas que fue almacenado congelado (-20 °C) para posteriormente determinar la actividad enzimática. El residuo fue secado en una estufa a 110 °C durante por lo menos 8 h y pesado para la determinación de la MS residual.

Para la determinación de la actividad enzimática en el filtrado se utilizó carboximetilcelulosa (CMC, Sigma C5678) como sustrato, la cual fue diluida en una solución buffer fosfato (20 g/L). Un mililitro del filtrado y 2 mL de la solución de CMC fueron agregados en tubos de ensayo por duplicado e incubados en un baño maría a 39 °C durante 240 min. Se incluyeron tubos adicionales (por triplicado) conteniendo 1 mL del filtrado y 2 mL de buffer fosfato sin sustrato (Control 1) o 1 mL de buffer fosfato (sin la enzima) y 2 mL de la solución del sustrato (Control 2). Al finalizar la incubación todos los tubos fueron colocados dentro de un baño con agua hirviendo durante 6 min para detener la reacción enzimática. La liberación de azúcares reductores se cuantificó utilizando el método propuesto por Miller et al. (1960) con ácido 3,5-dinitrosalicílico y glucosa como estándar. La actividad enzimática fue expresada como mg de azúcares reductores por g de MS residual (**Azúcar/MSr**) y como mg de azúcares reductores liberados por mg de proteína (**Azúcar/Pr**), corregido por las concentraciones de azúcares reductores de los tubos control (Controles 1 y 2). La suma de las concentraciones de azúcares reductores en ambos controles fue restada de los valores de los tratamientos. Además, se expresó la actividad enzimática como mg de proteína (enzima) por gramo de MS residual (**Pr/MSr**).

El último día de mediciones se midió el pH ruminal (Fig. cada 2 h desde el inicio de la incubación y durante 24 h. Para lo cual se extrajo una muestra de líquido ruminal directamente del fondo del saco ventral del rumen, a través de la cánula y se evaluó inmediatamente el pH con un pHmetro digital (Marte Científica- MB-10, MG, Brasil).



**Fig. 3** Esquema de incubaciones ruminales y determinaciones realizadas para cada animal/día de incubación/periodo

### 6.3.2. Análisis químicos de alimentos ofrecidos y rechazados

Las muestras de los alimentos ofrecidos y rechazados (si existían), fueron pre-secados en estufa de aire forzado a 55 °C por aproximadamente 72 horas siendo, inmediatamente, molidas en un molino tipo “Willey” a 1-2 mm y acondicionadas en frascos identificados.

Se determinaron, en esas muestras, los contenidos de MS en estufa a 105 °C hasta peso constante. El contenido de cenizas fue determinado por combustión a 600 °C durante 4 horas (Silva & Queiroz, 2002) y el contenido de N total por el método Kjeldahl (Método 984.13, AOAC, 1997). Para la determinación de la concentración de FND las muestras fueron acondicionadas en bolsitas de poliéster (Komarek, 1993) tratadas con solución detergente neutro en autoclave a 110°C por 40 minutos (Senger et al., 2008), incluyendo  $\alpha$ -amilasa en las muestras de concentrado (Mertens, 2002). Las concentraciones de FAD fueron determinadas de acuerdo con AOAC (1997, método 973.18). Los resultados de FND y FAD fueron expresadas incluyendo las cenizas residuales.

### 6.3.3. Análisis estadístico

Los datos fueron comparados entre tratamientos utilizando el procedimiento mixto del software SAS (versión 8.2; SAS Institute, Cary, NC, USA). Para las variables de consumo de nutrientes y pH ruminal el modelo utilizado fue:

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + P_j + T_k + e_{ijk},$$

donde  $Y_{ijk}$  fue la variable dependiente,  $\mu$  fue la media general,  $A_i$  el efecto fijo del animal ( $n = 3$  animales),  $P_j$  el efecto fijo del período ( $j = 3$  períodos),  $T_k$  el efecto fijo de los tratamientos ( $k = \text{RTM, RTM+F, Forraje}$ ) y  $e_{ijk}$  el error residual.

Para las variables resultantes de la incubación en rumen (MSD, P<sub>bac</sub>, Azúcar/MSr, Azúcar/Pr y Pr/MSr) se utilizó el mismo modelo pero se compararon por separado los tratamientos en los que se incubaron los mismos sustratos: RTM vs. RTM+F y Forraje vs. RTM+F ( $k = \text{RTM, RTM+F ó Forraje, RTM+F}$ ). O sea que, se compararon los datos de los tratamientos Forraje vs. RTM+F empleando los datos obtenidos utilizando forraje como sustrato incubado. Los datos de los tratamientos RTM vs. RTM+F se compararon empleando los datos obtenidos utilizando el ensilado como sustrato.

Se declararon como diferencias significativas a valores de  $P \leq 0,05$  y cuando P presentó valores entre 0,05 y 0,10 se consideraron como tendencias a diferencias.

## **7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **7.1. EXPERIMENTO Ia**

La adición de NaHCO<sub>3</sub> y MgO no afectó significativamente el consumo de nutrientes ni el comportamiento ingestivo (Cuadro IV). Sin embargo, el uso de aditivos aumentó el consumo diario total de agua ( $P = 0,05$ ), específicamente tendiendo a aumentar el consumo de agua de bebida ( $P = 0,08$ ).

**Cuadro IV.** Consumo y comportamiento ingestivo en borregos alimentados con forraje fresco sin (Control) y con la adición de una mezcla de NaHCO<sub>3</sub> y MgO (Buffer)

	Control	Buffer	EEM <sup>b</sup>	P
<i>Minutos totales<sup>a</sup></i>				
Ingestión	187	215	18,7	0,14
Rumia	49	37	9,0	0,21
Descanso	120	105	15,5	0,38
<i>Consumo, g/d</i>				
MS	820	920	78,5	0,29
MO	721	799	67,9	0,35
FND	362	406	36,0	0,34
FAD	212	237	21,9	0,38
<i>Consumo de agua</i>				
Bebida, mL/d	322	632	---	---
Bebida, log <sub>10</sub>	1,77	2,17	0,301	0,08
Forraje, mL/d	575	647	55,2	0,28
Total, mL/d	897	1278	156,3	0,05

<sup>a</sup> Minutos totales durante las primeras 6 h desde el inicio de la ingesta; <sup>b</sup> error estándar de las medias (n=6 / tratamiento).

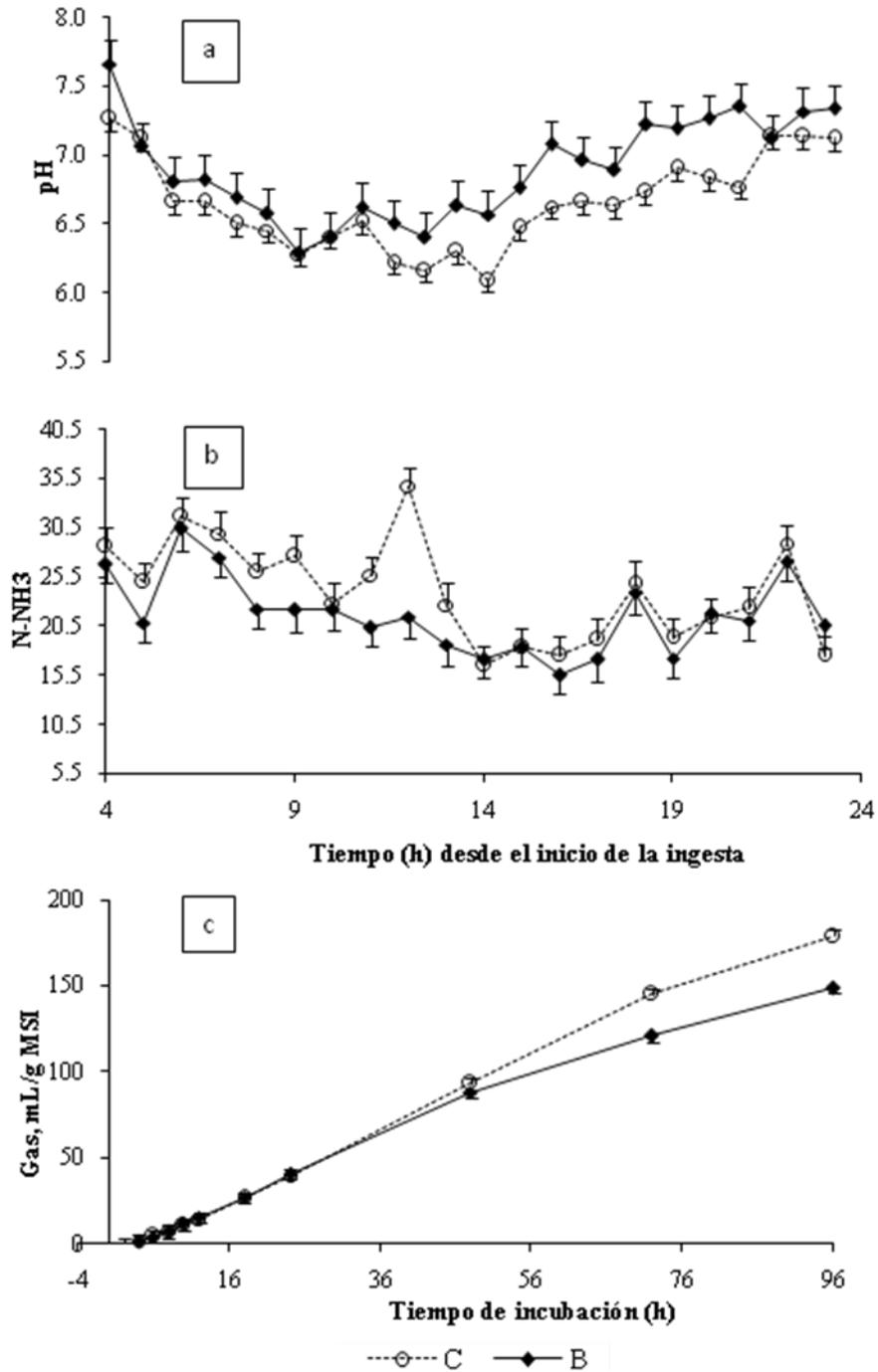
La digestibilidad y retención del N no fueron afectadas por los tratamientos, pero el tiempo de tránsito (TT) y la tasa de salida de partículas desde el ciego-colon (k<sub>2</sub>) tendieron a ser mayores (P = 0,09 y 0,09, respectivamente), mientras que el tiempo medio de retención total (TMRT) tendió a ser menor (P = 0,09) en los borregos suplementados (Cuadro V). Aunque no se encontraron diferencias en la SNM ni en su eficiencia, el uso de buffer aumentó la excreción urinaria de derivados purina (Cuadro V). A pesar de que la excreción urinaria no fue afectada por los tratamientos (P = 0,96), el uso de buffer aumentó la eliminación urinaria de Na (P = 0,01).

**Cuadro V.** Cinética de pasaje, coeficientes de digestibilidad aparente, excreción urinaria total y de sodio, balance de nitrógeno y síntesis de proteína microbiana en borregos alimentados con forraje fresco sin (Control) y con la adición de una mezcla de NaHCO<sub>3</sub> y MgO (Buffer)

	Control	Buffer	EEM <sup>h</sup>	P
<i>Tránsito de la digesta</i>				
k1 <sup>a</sup>	0,052	0,116	0,0242	0,11
k2 <sup>b</sup>	0,086	1,113	0,0144	0,09
TT <sup>c</sup>	20,3	24,7	1,60	0,08
TMRT <sup>d</sup>	53,8	45,2	3,24	0,09
<i>Coefficientes de digestibilidad</i>				
MS	0,61	0,59	0,027	0,42
MO	0,64	0,64	0,026	0,92
FND	0,41	0,43	0,043	0,71
FAD	0,32	0,32	0,051	0,88
N	0,70	0,72	0,021	0,92
<i>Excreción urinaria</i>				
Total, mL/d	1413	1433	282,1	0,96
Na, mg/d	623,2	2205	331,6	0,01
<i>Balance de N, g/d</i>				
N ingerido	19,0	20,6	1,98	0,11
N fecal	5,6	5,9	0,77	0,65
N urinario	7,8	8,2	1,35	0,82
N retenido	5,8	6,5	1,43	0,71
<i>Síntesis de proteína microbiana</i>				
NDP, g/d <sup>e</sup>	0,22	0,47	0,079	<0,05
SNM, g/d <sup>f</sup>	3,17	5,38	0,896	0,12
SNM, g/kg DOMI <sup>g</sup>	6,7	10,7	1,88	0,19

<sup>a y b</sup> Tasa de salida del rumen y ciego-colon, respectivamente (h<sup>-1</sup>); <sup>c</sup> pasaje de la digesta a través del sector posterior al rumen (h); <sup>d</sup> tiempo medio de retención total (h); <sup>e</sup> excreción de N de derivados púricos totales; <sup>f</sup> síntesis de N microbiano; <sup>g</sup> eficiencia de síntesis de N microbiano expresada en relación a la MO aparentemente digestible ingerida; <sup>h</sup> error estándar de las medias (n=6 / tratamiento).

No se observaron interacciones entre tratamiento y hora para el pH (P = 0,27) o N-NH<sub>3</sub> (P = 0,42). El agregado de buffer aumentó el pH ruminal (Fig. 4), con valores medios de 6,66 para Control y 6,90 para Buffer (EEM = 0,060, P <0,001). Las concentraciones medias de N-NH<sub>3</sub> fueron de 23,5 para Control y 21,2 mg/dL para Buffer, con una tendencia a ser menores en los animales suplementados (EEM = 0,81, P = 0,05). Cuando el líquido ruminal fue utilizado como inóculo, para evaluar la actividad fermentativa, el uso de aditivos condujo a una menor producción de gas *in vitro* (Fig. 4; P = 0,01).



**Fig. 4** Dinámicas de pH (a), concentración de N-NH<sub>3</sub> (b) ( $n = 6$  por tratamiento) y producción de gas *in vitro* (mL/g MS ingerida) hasta la hora 96 (c;  $n = 3$  por tratamiento) de borregos alimentados únicamente con forraje fresco durante 6h/d sin aditivos (Control: "C") y borregos alimentados únicamente con forraje fresco y con una mezcla de NaHCO<sub>3</sub> y MgO (Buffer: "B") (valores medios  $\pm$  error estándar).

Este estudio demostró algunos efectos interesantes de la suplementación con buffer a ovinos alimentados únicamente con pasturas, a pesar de que para algunas variables medidas el número de animales no fue suficiente para detectar diferencias entre tratamientos (reflejado en los altos errores estándar observados). Por ejemplo, aunque no se observaron diferencias en las tasas de salida del rumen ( $k_1$ ), la tendencia a un menor TMRT en los animales suplementados con buffer parecería estar relacionada con el mayor consumo de agua, y apoya a la hipótesis de Russell & Chow (1993) que indican que el impacto de los buffers puede ser parcialmente explicado por un aumento en la tasa de dilución del rumen. Rauch et al. (2012), trabajando con vacas lecheras consumiendo RTM, observaron que la suplementación con bicarbonato de sodio condujo a una menor digestibilidad de la MS, y asociaron esta observación con un aumento en la tasa de pasaje. El efecto negativo de una alta tasa de pasaje en la digestibilidad no ocurrió en este estudio, posiblemente debido al relativamente bajo consumo de MS (es decir, 49 g/kg de PV metabólico) de los borregos, comparado con el consumo reportado por los autores citados en vacas lecheras (de 235 g/kg de PV metabólico).

Aunque nosotros no logramos detectar diferencias en la síntesis de proteína microbiana, la alta excreción de derivados de purina excretados en la orina de los borregos suplementados sugiere un elevado flujo de N microbiano al duodeno. Esto es consistente con la mayor tasa de dilución, y el menor tiempo de tránsito, en los borregos suplementados. Además, algunos autores han sugerido que la suplementación con Mg puede aumentar el crecimiento microbiano ruminal (Galbraith et al., 1971).

El elevado pH ruminal de los borregos que consumieron buffer se encuentra dentro de lo esperado, incluso considerando que éste fue relativamente alto ( $> 6$ ) durante todo el día. En efecto, la restricción en el tiempo de acceso al forraje no afectó el pH ruminal, como fue previamente reportado por Pérez-Ruchel et al. (2013). Sin embargo, este aumento no se vio reflejado en una cantidad de MSI como reportaron Sharif et al. (2010). La menor concentración de amoníaco, y la menor capacidad de fermentación que fue evidenciada por la menor producción de gas *in vitro* en los borregos suplementados podría indicar la presencia de un contenido ruminal más diluido debido a un mayor consumo de agua.

El agregado de buffer, condujo a una mayor excreción urinaria de Na como sugirieron previamente Rauch et al. (2012). A pesar de los efectos positivos de los buffers a nivel ruminal, la elevada excreción urinaria de Na en los borregos suplementados con buffer debería ser considerado por las implicancias ambientales potenciales.

## 7.2. EXPERIMENTO Ib

*Estudio 1:* El recuento de bacterias ruminales para los animales con 24 h de acceso al alimento se situó en  $4,5 \times 10^{10}$  cel/mL y el de los animales con acceso restringido en  $4,37 \times 10^{10}$  cel/mL. La restricción en el tiempo de acceso no afectó esta variable ( $P > 0,05$ ), pero modificó el perfil bacteriano ya que llevó a variaciones en algunos grupos (Cuadro VI).

**Cuadro VI** Recuentos absolutos de microorganismos ruminales ( $\log_{10}$  promedio de células/mL) y pH ruminal en animales alimentados con forraje fresco durante 24h o 6h por día

	Tiempo de acceso al forraje		EEM <sup>a</sup>	P
	24h	6h		
Eubacterias	10,4	10,1	0,13	0,145
<i>M. elsdenii</i>	9,63	8,76	0,36	0,166
<i>Propionibacterium</i> spp.	8,98	8,64	0,14	0,215
<i>R. albus</i>	9,13	8,74	0,10	0,052
<i>R. flavefaciens</i>	9,08	8,71	0,09	0,041
<i>S. ruminantum</i>	8,89	8,37	0,08	0,008
<i>Streptococcus</i> spp.	7,86	7,88	0,14	0,924
pH	6,75	6,77	0,10	0,842

<sup>a</sup> Error estándar de las medias ( $n= 3/\text{tratamiento}$ ). Para cada fila letras diferentes entre medias son diferentes significativamente ( $P \leq 0,05$ ).

Los recuentos de *R. albus*, *R. flavefaciens* y *S. ruminantum* fueron mayores en las muestras correspondientes a los animales del grupo 24h que en aquellas de los animales del grupo 6h (Cuadro VI), mientras que las poblaciones de *M. elsdenii*, *Propionibacterium* spp., y *Streptococcus* spp., no fueron afectadas por los tratamientos. No se registraron diferencias en el pH ruminal entre los animales de ambos tratamientos.

*Estudio 2:* En el Cuadro VII se presenta la evolución diurna del número de microorganismos y del pH ruminal en los animales alimentados durante 6 h por día. Como se observa, si bien el pH ruminal fue menor a la hora 4 y 8 en relación a la hora 0 desde el inicio de la ingesta, los recuentos de bacterias totales, tendieron a ser menores a las 4 y 8 h ( $P = 0,077$ ) sin diferencias para las distintos grupos bacterianos analizados.

**Cuadro VII.** Recuentos absolutos de microorganismos ruminales ( $\log_{10}$  promedio de células/mL) y pH ruminal en animales alimentados durante 6 h a las horas 0, 4 y 8 desde el inicio de la ingesta

	Tiempo desde el inicio de la ingesta			EEM <sup>a</sup>	P
	0h	4h	8h		
Eubacterias	10,44 <sup>x</sup>	10,09 <sup>y</sup>	10,20 <sup>y</sup>	0,08	0,077
<i>M. elsdenii</i>	8,83	8,76	9,07	0,27	0,723
<i>Propionibacterium</i> spp.	8,85	8,64	9,18	0,24	0,302
<i>R. albus</i>	8,96	8,74	9,10	0,21	0,527
<i>R. flavefaciens</i>	8,90	8,71	9,14	0,35	0,716
<i>S. ruminantum</i>	8,91	8,37	8,91	0,30	0,408
<i>Streptococcus</i> spp.	7,87	7,88	8,11	0,24	0,747
pH	7,27 <sup>a</sup>	6,51 <sup>b</sup>	6,52 <sup>b</sup>	0,18	0,006

<sup>a</sup> Error estándar de las medias (n= 3/h). Para cada fila letras diferentes entre medias son diferentes significativamente (a, b:  $P \leq 0,05$ ; x, y:  $0,05 < P < 0,10$ ).

A partir de los resultados obtenidos se puede decir que el tiempo de acceso al forraje no afectó la cantidad de bacterias totales. Los recuentos de bacterias totales que se ubicaron en torno a  $10^{10}$  células/mL de contenido ruminal, se encuentran dentro de las cantidades descritas en la literatura (Kamra, 2005; Arcuri et al., 2011). Algunos grupos bacterianos fueron afectados en forma importante por la restricción. En particular, las especies fibrolíticas *R. flavefaciens* y *R. albus* se vieron significativamente disminuidas en los animales que consumieron pastura solamente durante 6 h al día. Las bacterias fibrolíticas son sensibles a variaciones en el pH ruminal y dependen del N-NH<sub>3</sub> ruminal ya que lo utilizan como principal fuente de nitrógeno (Bryant & Robinson, 1961; Grant & Mertens, 1992). En este experimento los valores de pH ruminal fueron cercanos a la neutralidad y similares entre tratamientos. Por otra parte no se observaron diferencias entre tratamientos en las concentraciones de N-NH<sub>3</sub>. En el otro estudio derivado de este mismo experimento mencionado, en el que se determinó la concentración de N-NH<sub>3</sub> durante 24 h, la concentración media fue de 23,7 y 23,5 mg/dL (para animales alimentados durante todo el día o durante 6 h/d, respectivamente), ubicándose los valores mínimos en niveles superiores a 16 mg/dL (Pérez-Ruchel et al., 2013), lo que se sitúa por encima de los niveles mínimos necesarios para el óptimo crecimiento microbiano (Satter & Slyter, 1974). Ninguno de estos dos factores (pH y concentración de amonio) parece haber estado relacionado con la menor concentración de bacterias fibrolíticas observadas en este experimento. Estos resultados podrían estar vinculados a otros factores, como variaciones del ambiente ruminal (ejemplo: presión osmótica), o a la disponibilidad de sustratos, a los cuales es sensible este tipo de microorganismo. Consistentemente con el resultado anterior, cuando se evaluó la actividad fermentativa del inóculo ruminal de estos mismos animales sobre un sustrato fibroso (paja de trigo) mediante la técnica de producción de gas, se observó que el inóculo de los animales alimentados durante 6 h/d presentó una menor actividad, generando menor volumen de gas (Pérez-Ruchel et al., 2013).

Otra especie afectada por la restricción alimenticia fue *S. ruminantium*, bacteria muy importante en el control de la acidosis subclínica ya que es capaz de consumir lactato y producir propionato (Strobel & Russell, 1986) que se absorbe por la pared ruminal. Este resultado podría estar indicando una situación más desfavorable para las bacterias consumidoras de lactato en aquellos animales sometidos a restricción.

La disminución observada en las especies de bacterias fibrolíticas estudiadas y en *S. ruminantium* (consumidora de lactato), podría explicarse por la menor disponibilidad de sustratos (dada por un menor consumo de MO) y/o por el menor tiempo de retención del alimento en el rumen, ambos resultados observados por Pérez-Ruchel et al., (2013) en este mismo experimento para los animales alimentados durante 6h en comparación con los alimentados durante todo el día. En este sentido, es de considerar el hecho de que las bacterias fibrolíticas, además de presentar elevados tiempos de generación, deben adherirse a la partículas de la fibra vegetal para poder digerirla (Krause et al., 2003), lo que haría más sensible a este grupo a disminuciones en el tiempo de retención ruminal.

En los animales alimentados durante un período de tiempo restringido, el número de bacterias totales tendió a ser inferior a las 4 y 8 horas desde el inicio de la ingesta,

respecto a la hora 0. Este resultado coincide con lo reportado por Lascano et al., (2009), quienes evaluando diferentes niveles de concentrados y de levaduras en vaquillonas lecheras, encontraron que los recuentos de células viables disminuyeron desde el inicio de la alimentación hacia la hora 4 y al mismo tiempo aumentaron las células muertas. Según Arcuri et al., (2011), a partir del inicio de la ingesta ocurriría una reducción en el número de microorganismos por mL de contenido ruminal debido a un aumento en la dilución del mismo causada por el ingreso de alimento fresco, agua y saliva al retículo-rumen.

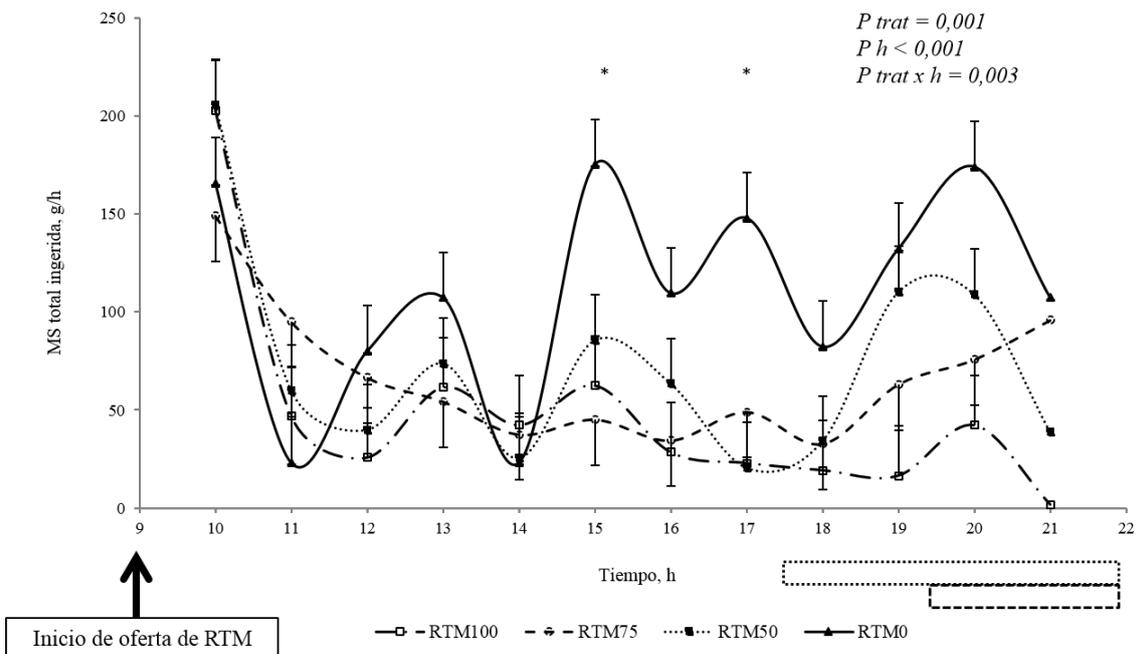
### 7.3. EXPERIMENTO IIa

El consumo diario de MS (MSI) aumentó linealmente a medida que el nivel de RTM en la dieta disminuyó ( $P = 0,004$ , Cuadro VIII). Los valores promedio expresados como g/kg PV fueron de 30 (RTM100), 37 (RTM75), 35 (RTM50) y 43 (RTM0) (EEM = 2,80;  $P = 0,004$ ). En base a los consumos reales de RTM y de forraje, las relaciones de RTM y forraje en la dieta fueron de 56:44 y 38:62 para RTM75 y RTM50, respectivamente. El consumo de todos los nutrientes se comportó de forma similar a la MSI (con un aumento lineal en el consumo de MO, N, aFNDmo, FADmo y EM a medida que aumentó el nivel de forraje en la dieta). Los mayores niveles de forraje ingerido por los corderos alimentados con menores niveles de RTM se relacionaron con un mayor tiempo destinado a las actividades de ingestión y rumia, y con un menor tiempo destinado a descansar (Cuadro VIII). Sin embargo, solamente el tiempo de descanso disminuyó significativamente con el aumento en el consumo de forraje cuando las actividades comportamentales se expresaron como minutos totales por día en relación a la cantidad de MS y aFNDmo ingeridas (Cuadro VIII). Los corderos comieron más rápido a medida que el nivel de RTM disminuyó ( $P < 0,001$ , Cuadro VIII), y la forma de las curvas de las tasas de ingestión también fue afectada por los tratamientos ya que se encontraron interacciones significativas entre tratamiento y tiempo ( $P = 0,003$ ; Fig. 5). Los animales alimentados solo con forraje fresco aumentaron notoriamente su tasa de ingestión a las 15:00 h, inmediatamente luego del suministro de forraje fresco recién cortado. Además, como los animales alimentados con RTM y forraje recibieron el forraje una vez que terminaban de ingerir las cantidades fijas de RTM, en realidad comenzaron a consumir el forraje a las 19:30 y 17:30 h en promedio para RTM75 y RTM50 respectivamente (Fig. 5).

**Cuadro VIII.** Consumo de nutrientes, comportamiento ingestivo y tasa de ingestión en corderos alimentados con RTM (RTM100), RTM 0,75 y forraje (RTM75), RTM 0,50 y forraje (RTM50) o solo forraje (RTM0)

	RTM100	RTM75	RTM50	RTM0	EEM <sup>c</sup>	P <sup>d</sup>	
						L	C
<i>MSI (g/d)<sup>a</sup></i>							
RTM	753	514	338	—	10,8	<0,001	0,260
Forraje	—	404	548	1080	63,1	<0,001	0,368
Total	753	918	886	1080	75,9	0,004	0,958
<i>Consumo de nutrientes (g/d, base seca)<sup>b</sup></i>							
MO	738	859	805	1021	68,2	0,009	0,662
N	25,7	29,8	27,1	36,8	3,27	0,012	0,427
aFNDmo	260	300	297	376	29,7	0,004	0,822
FADmo	159	208	211	291	20,9	<0,001	0,928
<i>EM ingerida (Mcal/d, base seca)</i>							
RTM	1,83	1,24	0,81	—	0,08	<0,001	0,260
Forraje	—	0,95	1,29	2,54	0,14	<0,001	0,316
Total	1,83	2,19	2,10	2,54	0,03	0,006	0,970
<i>Comportamiento ingestivo</i>							
<i>Min totales/d</i>							
Ingestión	313	454	400	519	31,1	0,002	0,654
Rumia	390	383	470	494	23,7	0,001	0,537
Descanso	739	599	564	427	37,6	<0,001	0,421
<i>Min/kg MS</i>							
Ingestión	427	512	483	489	61,2	0,688	0,603
Rumia	530	419	577	465	61,1	0,730	0,670
Descanso	1002	702	674	397	80,1	<0,001	0,464
<i>Min/kg aFNDmo</i>							
Ingestión	1261	1570	1473	1444	234	0,826	0,544
Rumia	1560	1283	1761	1357	224	0,621	0,521
Descanso	2956	2152	2066	1138	271	<0,001	0,663
<i>Tasa de ingestión</i>							
MS g/h	50,6	66,1	74,4	109	9,66	<0,001	0,689

<sup>a</sup> Consumo de material seca; <sup>b</sup> MO: material orgánica; N: nitrógeno; aFNDmo: fibra neutro detergente analizada con amilasa termo estable y sulfito de sodio, corregida por blancos y expresada sin cenizas residuales; FADmo: fibra ácido detergente corregida por blancos y expresada sin cenizas residuales; <sup>c</sup> Error estándar de las medias (n = 6/tratamiento); <sup>d</sup> Nivel de significancia: efecto lineal (L) y cuadrático (C) del nivel decreciente de RTM en la dieta.



**Fig. 5** Tasa de ingestión (MS ingerida en total g/h) durante las primeras 12 h desde el inicio del suministro de RTM (09:00 h) en corderos alimentados con RTM (RTM100), RTM 0,75 y forraje (RTM75), RTM 0,50 y forraje (RTM50) o solo forraje (RTM0). Las barras punteadas inferiores indican el período de tiempo en el cual los animales de los tratamientos RTM75 y RTM50 tuvieron acceso al forraje. Valores medios  $\pm$  error estándar; \* =  $P \leq 0,05$ .

La digestibilidad de la MO disminuyó linealmente y la digestibilidad del N tendió a ser menor a medida que el nivel de RTM disminuyó (Cuadro IX). La digestibilidad de la aFNDmo mostró una respuesta cuadrática ( $P = 0,032$ ), con mayores valores para los corderos alimentados solo con RTM (RTM100). Además, no se observaron diferencias en las tasas de salida de partículas desde el rumen y ciego-colon ( $k_1$  y  $k_2$ , respectivamente) (Cuadro IX), pero el tiempo medio de retención total (TMRT) varió cuadráticamente con el tratamiento ( $P = 0,020$ ), con menores tiempos de retención para las dietas puras (RTM100 y RTM0).

**Cuadro IX.** Coeficientes de digestibilidad aparente y cinética de pasaje en corderos alimentados con RTM (RTM100), RTM 0,75 y forraje (RTM75), RTM 0,50 y forraje (RTM50) o solo forraje (RTM0)

	RTM100	RTM75	RTM50	RTM0	EEM <sup>c</sup>	P <sup>d</sup>	
						L	C
<i>Coeficientes de digestibilidad<sup>a</sup></i>							
MS	0,70	0,74	0,70	0,69	0,03	0,601	0,756
MO	0,76	0,75	0,72	0,72	0,01	0,018	0,174
N	0,81	0,76	0,73	0,73	0,03	0,051	0,496
<sup>a</sup> FND <sub>mo</sub>	0,62	0,60	0,52	0,57	0,02	0,196	0,032
FAD <sub>mo</sub>	0,52	0,54	0,40	0,47	0,03	0,989	0,150
<i>Tránsito de la digesta<sup>b</sup></i>							
k1, h <sup>-1</sup>	0,083	0,081	0,058	0,066	0,01	0,226	0,356
k2, h <sup>-1</sup>	0,371	0,399	0,193	0,519	0,09	0,428	0,109
TT, h	11,1	13,8	11,6	10,6	1,27	0,363	0,279
TMRT, h	26,8	31,0	35,5	28,1	2,46	0,930	0,020

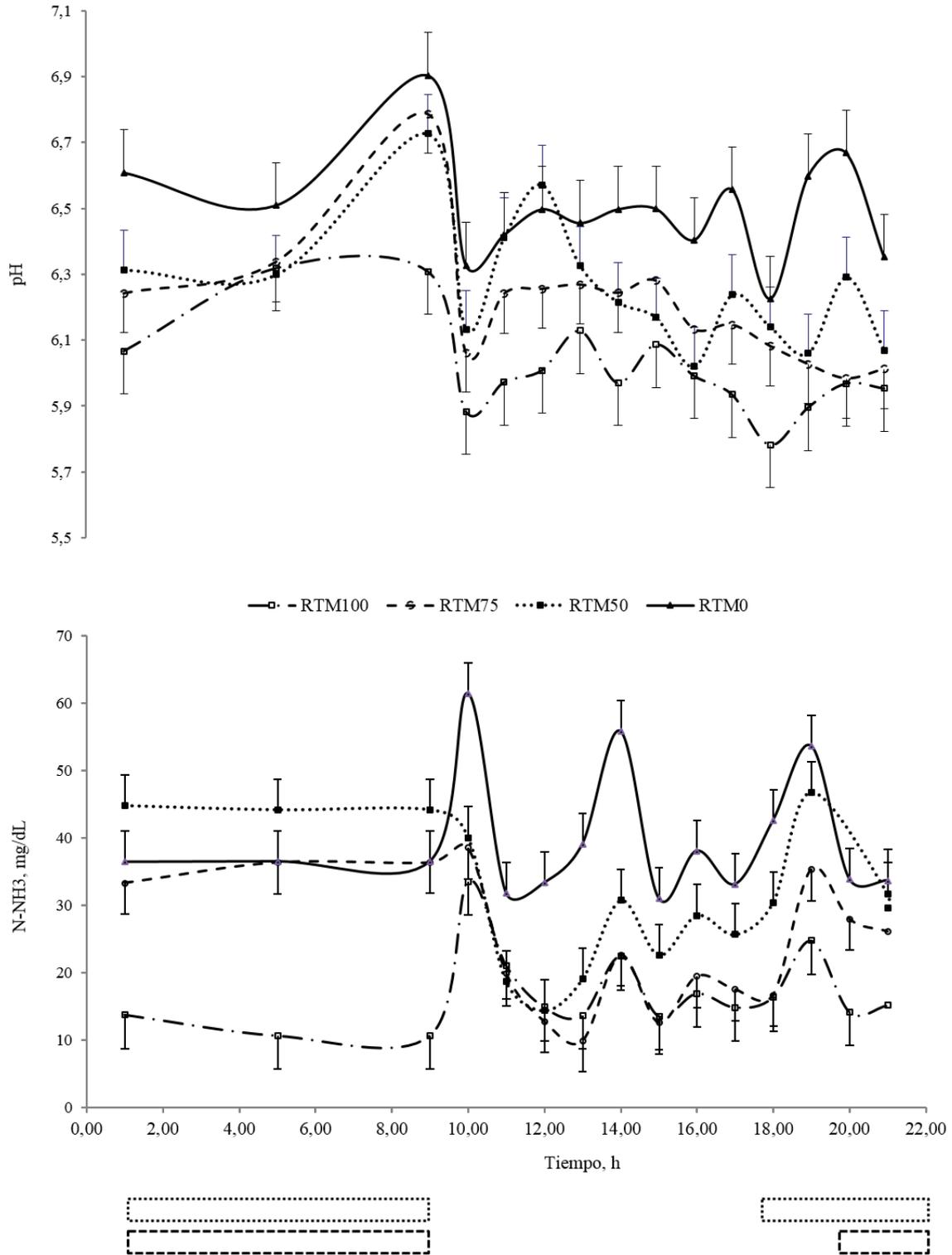
<sup>a</sup> MS: material seca, MO: material orgánica, N: nitrógeno, <sup>a</sup>FND<sub>mo</sub>: fibra neutro detergente (analizada con amilasa termo estable y sulfito de sodio, corregida por blancos y expresada libre de cenizas), FAD<sub>mo</sub>: fibra ácido detergente (corregida por blancos y expresada libre de cenizas); <sup>b</sup> k1-2: tasa de salida de partículas a través del rumen y ciego-colon respectivamente; TT: tiempo de tránsito; TMRT: tiempo medio de retención total; <sup>c</sup> error estándar de las medias (n = 6/tratamiento); <sup>d</sup> nivel de significancia: efectos lineal (L) y cuadrático (C) de la disminución en el nivel de RTM en la dieta.

Los valores medios de pH ruminal aumentaron linealmente con la disminución en los niveles de RTM (Cuadro X), sin interacciones significativas entre tratamiento y tiempo (P = 0,827, Fig. 6). En general, los AGV presentaron una respuesta cuadrática; las concentraciones totales de AGV y de acético fueron más altas, y la de propiónico fue más baja, cuando los corderos consumieron las dietas mixtas (RTM50 y RTM75, Cuadro X). La concentración de N-NH<sub>3</sub> en el rumen aumentó linealmente con la disminución de la RTM (Cuadro X), con interacciones significativas entre tratamiento y tiempo, y una mayor variabilidad para los animales alimentados con las dietas mixtas respecto a los animales alimentados solo con RTM o solo forraje (P = 0,032, Fig. 6).

**Cuadro X.** pH, concentraciones de ácidos grasos volátiles (AGV), expresados en mM y como % respecto a los totales, y concentración de N-NH<sub>3</sub> (mg/dL) en el líquido ruminal de corderos alimentados con RTM (RTM100), RTM 0,75 y forraje (RTM75), RTM 0,50 y forraje (RTM50) o solo forraje (RTM0)

	RTM100	RTM75	RTM50	RTM0	EEM <sup>c</sup>	P <sup>d</sup>				
						T	t	Txt	L	C
pH	6,04	6,27	6,20	6,50	0,04	<0,001	<0,001	0,827	<0,001	0,699
AGV <sup>a</sup>	165	161	179	150	11,0	0,27	<0,001	0,068	0,733	0,023
<i>Acético</i>										
mM	78,6	80,1	86,1	70,8	5,95	0,30	<0,001	0,122	0,797	0,020
% <sup>b</sup>	48	51	49	49	2,00	0,71	<0,001	0,908	0,288	0,357
<i>Propiónico</i>										
mM	55,9	50,2	54,4	46,2	4,34	0,33	<0,001	0,242	0,340	0,019
% <sup>b</sup>	34	31	31	30	1,06	0,07	<0,001	0,075	0,016	0,693
<i>Butírico</i>										
mM	30,7	29,8	38,0	32,2	3,25	0,25	<0,001	0,357	0,640	0,170
% <sup>b</sup>	18	17	20	20	1,13	0,30	<0,001	0,428	0,832	0,269
N-NH <sub>3</sub>	17,6	23,5	30,5	40,0	2,28	<0,001	<0,001	0,032	<0,001	0,435

<sup>a</sup> Concentración de ácidos grasos volátiles (acético + propiónico + butírico), mM/L; <sup>b</sup> proporción respecto a la concentración de los AGV totales; <sup>c</sup> error estándar de las medias (n = 6/tratamiento); <sup>d</sup> nivel de significancia del tratamiento (T), tiempo (t), interacción tratamiento x tiempo (Txt); efectos lineal (L) y cuadrático (C) de la disminución del nivel de RTM en la dieta.



**Fig. 6** Dinámica de pH ruminal y concentraciones de N-NH<sub>3</sub> en corderos alimentados con RTM (RTM100), RTM 0,75 y forraje (RTM75), RTM 0,50 y forraje (RTM50) o solo forraje (RTM0). Las barras punteadas inferiores indican el período de tiempo en el cual los animales de los tratamientos RTM75 y RTM50 tuvieron acceso al forraje. Valores medios  $\pm$  error estándar; \*P  $\leq$  0,05.

El nivel de ingesta de los corderos fue elevado en relación al rango esperado de acuerdo al PV y categoría, el cual varía entre 29,3 y 30,4 g/kg PV según el NRC (2007). La alta ingestión de forraje puede ser explicada por su elevada digestibilidad. Sin embargo, el resultado más llamativo fue que, por cada unidad de RTM administrada de menos, los corderos ingirieron en promedio 1,5 veces de MS de forraje, generando un aumento en el consumo a medida que disminuyó la RTM. Además, aumentó el consumo de todos los nutrientes, incluso de la energía, a medida que el nivel de RTM en la dieta disminuyó.

El consumo de fibra en promedio fue alto, y aumentó con la proporción de forraje consumido en la dieta, indicando que el nivel de fibra no actuó como un factor limitante para el consumo, aún cuando los niveles de consumo de fibra presentaron valores entre 320 y 340 g/kg de la dieta total. Esto probablemente esté relacionado con la alta digestibilidad de la FND de la alfalfa fresca (Burns et al., 2005; Brito et al., 2009). Aunque no se detectaron diferencias en la tasa de salida de las partículas, la leve disminución de la digestibilidad de la MO a medida que se incrementó la proporción de forraje en la dieta estaría relacionada al aumento en el nivel de consumo.

El pH y las concentraciones ruminales de N-NH<sub>3</sub> aumentaron de acuerdo a lo esperado a medida que aumentó el consumo de forraje. La menor concentración de AGV totales y de acético en los animales alimentados solo con forraje no puede ser fácilmente explicada pero se relacionaría con la mayor ingesta que se asoció con un menor TMRT y menor digestibilidad de la aFNDmo. De todas maneras, nosotros medimos concentraciones instantáneas y no cantidades de AGV. Es sabido que la concentración de AGV depende de su producción, pero también de la tasa de pasaje con el fluido al omaso y de la absorción a través de las paredes del rumen (Dijkstra et al., 1993).

El aumento en el consumo a medida que disminuyó el nivel de RTM en la dieta no se debió a un mayor tránsito de la digesta ya que éste no fue afectado por los tratamientos. Las diferencias registradas en el consumo fueron consistentes con los cambios observados en el comportamiento ingestivo y en la tasa de ingestión y podrían estar relacionados a las preferencias alimentarias de los corderos. En este sentido, aunque el diseño no fue realizado para evaluar preferencias, el aumento en la tasa de consumo observada cuando el forraje fue administrado indicaría que los corderos prefirieron el forraje fresco en vez de la RTM, y este comportamiento podría estar relacionado con la elevada concentración de azúcares registrados en el forraje. De hecho, la preferencia de los rumiantes por alimentos con mayores concentraciones de azúcares ha sido ya descrita por otros autores (Jones & Roberts, 1991; Fisher et al., 1999), y varios autores también describieron un mayor consumo de forrajes con mayores concentraciones de azúcares (Lee et al., 2002; Burns et al., 2005, Moorby et al., 2006, Brito et al., 2009). Es notorio que los corderos que consumieron únicamente forraje aumentaron considerablemente su tasa de ingestión cuando se ofreció el forraje fresco recién cortado (a las 14:00 h). Parecería que la oferta de forraje recién cortado fue un fuerte estímulo para el consumo, aún mayor que el observado cuando los animales cambiaron de un alimento a otro en los animales alimentados con RTM y forraje (RTM75 y RTM50).

Diferentes autores han hipotetizado que el consumo limitado de energía en animales alimentados con pasturas causaría el depósito de grasa menos desarrollado en la carcasa de los mismos respecto a aquellos alimentados solo con RTM (Murphy et al., 1994; Aurousseau et al., 2007 y Carrasco et al., 2009). Sin embargo, en base a estos

resultados, parecería ser que las carcasas más magras no serían debido a eso sino a la ingestión de una mayor relación proteína/energía a medida que aumentó el consumo de energía. Los valores medios de la relación proteína/energía fueron de 88 (RTM100), 85 (RTM75), 81 (RTM50) y 91 g PB/ Mcal de EM (RTM0). En este sentido, Blome et al. (2003) encontraron que incrementando el nivel de proteína bruta en los lacto-reemplazantes desde 16 a 26%, con el correspondiente aumento en la relación proteína:energía de la dieta, aumentó linealmente las tasas de crecimiento de los terneros, a pesar de que la deposición total de energía se mantuvo sin variación.

Sin dudas, el efecto principal de los tratamientos en este trabajo fue sobre el consumo de nutrientes, el cual fue mayor en forma consistente con la elevada palatabilidad del forraje fresco (principalmente debido a la alfalfa). Este efecto habría liderado o conducido a los efectos encontrados en el ambiente ruminal y la digestión. Por lo tanto, la palatabilidad de los alimentos representaría un factor clave a considerar cuando se proveen alimentos de alta calidad en cantidades suficientes para maximizar los resultados productivos.

#### 7.4. EXPERIMENTO IIb

Se detectaron diferencias entre los distintos líquidos ruminales (Cuadro XI) independientemente del sustrato utilizado, ya que no hubieron interacciones significativas entre inóculos y sustratos. La producción total de gas aumentó linealmente, mientras que la tasa de producción de gas (kd) disminuyó linealmente a medida que disminuyó el nivel de RTM en la dieta (Cuadro XI). El inóculo de los animales sometidos al tratamiento RTM75 resultó en un menor tiempo de latencia, sin diferencias entre los otros tratamientos.

Si bien, la evaluación de sustratos no fue objetivo de este trabajo, los valores promedio de a+b para cada sustrato fueron de 165, 172 y 264 mL/g MSi (EEM = 8,34), para el forraje, el ensilado de planta entera de maíz y el maíz incubados, respectivamente.

**Cuadro XI** Parámetros de producción de gas *in vitro* obtenidos utilizando líquido ruminal de los corderos alimentados con RTM, RTM 0,75 y forraje (RTM75), RTM 0,50 y forraje (RTM50) o solo forraje (RTM0)

	RTM100	RTM75	RTM50	RTM0	EEM	<i>P</i> <sup>†</sup>			
						I	S <sup>‡</sup>	I×S	L
a+b*	164	200	207	231	9,62	<0,001	<0,001	0,234	0,030
kd**	0,120	0,105	0,095	0,072	0,01	<0,001	<0,001	0,598	0,041
Lag***	1,34 <sup>a</sup>	0,71 <sup>b</sup>	1,44 <sup>a</sup>	1,44 <sup>a</sup>	0,17	0,006	<0,001	0,565	0,443

\* Producción de gas potencial (mL/ g MS incubada); \*\* tasa de producción de gas (h<sup>-1</sup>); \*\*\* tiempo lag (h); <sup>†</sup> efecto del inóculo (I); <sup>‡</sup> efecto del sustrato (S); efecto de la interacción inóculo × sustrato (I×S); efecto lineal de la disminución de RTM en la dieta (L). <sup>‡</sup> Las medias de cada sustrato no se muestran. <sup>a,b</sup> Dentro de cada columna, medias seguidas por letras diferentes son significativamente diferentes a una *P* ≤ 0,05.

El objetivo principal de esta parte del experimento fue estudiar la influencia de diferentes niveles de RTM y forraje fresco en la dieta de los animales (donadores) sobre

la actividad fermentativa de la microbiota ruminal (inóculo). Los resultados claramente muestran que a medida que el nivel de RTM en la dieta de los corderos donantes disminuyó, la producción de gas aumentó. Este resultado reflejaría fundamentalmente, el mayor ingreso de sustratos para la fermentación, dado a través del mayor consumo de nutrientes registrado, en la primera parte de este experimento, a medida que disminuyó el nivel de RTM en la dieta y aumentó el consumo de forraje fresco.

Sin embargo, la tasa de fermentación disminuyó a medida que el nivel de RTM en la dieta de los corderos donantes disminuyó. Este resultado podría relacionarse con la presencia de algún factor limitante para la fermentación o con una disminución repentina del pH debido al mayor contenido de almidón en la RTM. Aunque, considerando los resultados obtenidos en la primera parte de este experimento, ni las concentraciones de N-NH<sub>3</sub> (principal fuente de N para las bacterias ruminales) ni el pH ruminal resultaron una limitante para la fermentación. Según Russell (1993), la microbiota ruminal haría un uso preferencial por los carbohidratos de más fácil disponibilidad. Por lo tanto, la mayor tasa de producción de gas registrada a partir de los inóculos de los animales alimentados con mayores niveles de RTM en la dieta, podría estar asociada con los mayores niveles de CNE en la RTM respecto al forraje.

Más allá de los aspectos considerados anteriormente, este es un tema complejo, y debemos tomar en cuenta que ambas variables evaluadas (volumen y tasa de producción de gas) se vinculan con la actividad microbiana. Sin embargo, la más representativa de la actividad microbiana parecería ser la tasa de producción de gas y es la que, además, se vincula con el llenado ruminal y el consumo de los animales. Asumiendo ésto, y considerando los resultados encontrados a medida que disminuyó el nivel de RTM y aumentó el consumo de forraje, mediante esta prueba *in vitro*, los mismos no son coherentes con los resultados obtenidos *in vivo*. Esto podría deberse a limitaciones metodológicas, vinculadas fundamentalmente al inóculo utilizado y su representatividad de la microbiota ruminal.

Finalmente, el menor tiempo de latencia registrado con el inóculo extraído de los animales alimentados con un 75% de RTM en la dieta (RTM75) respecto a los otros inóculos, podría indicar que RTM75 habría promovido la actividad microbiana ruminal. Sin embargo, esta diferencia parecería ser más un artefacto matemático que biológico.

## 7.5. EXPERIMENTO III

El consumo de MS y MO fue menor para el tratamiento Forraje en comparación a los animales que recibían la dieta mixta (RTM+F, P = 0,034; P = 0,019 respectivamente) (Cuadro XII). Los animales alimentados únicamente con RTM consumieron menor cantidad de FND y FAD (P = 0,004; P = 0,001 respectivamente) que los animales que consumieron ambos alimentos (RTM y forraje, Cuadro XII).

Los valores promedio del pH ruminal no presentaron diferencias significativas entre los tratamientos, aunque se observaron mayores valores para el tratamiento Forraje, seguido del tratamiento RTM+F y, finalmente, RTM.

**Cuadro XII.** Consumo de nutrientes y pH ruminal en ovinos alimentados con Forraje (100%), RTM (100%) o RTM y Forraje (50:50, RTM+F)

	Forraje	RTM	RTM+F	EEM <sup>b</sup>	P
<i>Consumo (g/d)<sup>a</sup></i>					
MS	1284	1310	1751	182	0,325
MO	1083	1201	1553	159	0,297
PB	304	271	382	57,4	0,501
FND	689	378	687	48,6	0,069
FAD	335 <sup>a</sup>	147 <sup>b</sup>	317 <sup>a</sup>	23,4	0,049
<i>pH ruminal</i>	6,67	5,95	6,29	0,139	0,130

<sup>a</sup> MS: materia seca, MO: materia organica, PB: proteína bruta, FND: fibra neutro detergente, FAD: fibra ácido detergente; <sup>b</sup> error estándar de las medias

La desaparición ruminal de la materia seca incubada (%MSD) fue mayor cuando los animales recibían una dieta mixta en comparación con la dieta RTM (utilizando al ensilado como sustrato). El %MSD del forraje tendió (P = 0,085) a ser mayor en los animales cuya dieta consistía solo en forraje fresco comparado con los animales que consumían la dieta mixta (RTM+F, Cuadro XIII).

**Cuadro XIII** Parámetros ruminales de la incubación de cada sustrato: forraje o ensilado en ovinos alimentados con Forraje (100%), RTM (100%) o RTM y Forraje (50:50, RTM+F)

	Sustrato: forraje				Sustrato: ensilado			
	Forraje	RTM+F	EEM <sup>f</sup>	P	RTM	RTM+F	EEM <sup>f</sup>	P
<i>Adherencia bacteriana a partículas</i>								
Pbac. <sup>b</sup>	1,997	1,168	0,21	0,012	0,27	0,40	0,04	0,038
<i>Actividad fibrolítica bacteriana</i>								
Azúcar /MSr <sup>c</sup>	21,27	28,87	2,89	0,081	20,09	21,42	4,55	0,838
Azúcar/Pr <sup>d</sup>	44,78	80,69	12,3	0,056	80,60	87,97	17,0	0,763
Pr/MSr <sup>e</sup>	0,52	0,43	0,05	0,188	0,30	0,29	0,05	0,831
<i>%MSD<sup>a</sup></i>	74,6	69,2	2,09	0,085	58,7	63,6	0,99	0,003

<sup>a</sup> Porcentaje de la materia seca desaparecida del rumen en 24 h; <sup>b</sup> fósforo bacteriano (mg) /g de materia seca residual; <sup>c</sup> azúcares reductores (mg) /g materia seca residual; <sup>d</sup> azúcares reductores (mg) /g proteína; <sup>e</sup> proteína (mg) /g de materia seca residual; <sup>f</sup> error estándar de las medias.

El grado de adherencia de las bacterias fibrolíticas a las partículas, medido a través de las concentraciones de fósforo bacteriano (Pbac), fue afectada por los tratamientos. En general, los animales alimentados con mayor proporción de forraje fresco en la dieta

presentaron mayores concentraciones de P<sub>bac</sub> (Forraje respecto a RTM+F y RTM+F respecto a RTM, Cuadro XIII).

La actividad enzimática expresada como mg de azúcares reductores por gramo de MS residual (Azúcar/MSr) y como mg de azúcares reductores por gramo de proteína residual (Azúcar/Pr) tendió a ser mayor para los animales alimentados con los 2 alimentos (RTM+F) que para aquellos alimentados solo con forraje, cuando se incubó forraje en el rumen ( $P = 0,081$  y  $P = 0,056$ , respectivamente). Mientras que, cuando el sustrato incubado fue el ensilado, no se registraron diferencias entre tratamientos (Cuadro XIII).

Con este experimento se trató de complementar la información obtenida en el Experimento II, evaluando la actividad microbiana ruminal, específicamente la actividad fibrolítica de las bacterias ruminales (grado de adherencia y actividad enzimática fibrolítica, propiamente dicha).

A partir de los resultados obtenidos en este experimento no podemos verificar si existe una relación directa entre el pH ruminal y la degradabilidad de la fibra (desaparición de la MS de los sustratos fibrosos), tal como fue descrito anteriormente (Hu et al., 2004; Kozloski et al., 2008; Farenzena et al., 2013), debido al poco número de repeticiones.

Es sabido que para que la fibra sea degradada por las bacterias ruminales, éstas requieren de un primer paso de adherencia a las partículas para que luego puedan actuar sus enzimas. Este primer paso en la degradación de la fibra (adherencia) es crítico y no existe una técnica estandarizada para su medición. En este experimento, en el que más que el valor absoluto del grado de adherencia nos interesaba conocer las posibles diferencias entre tratamientos, se utilizó al fósforo bacteriano como marcador. Es sabido que el fósforo es un elemento clave en el metabolismo celular, por lo tanto está presente en las células microbianas. En este caso, al igual que el trabajo realizado previamente por Farenzena et al. (2013), se asumió que luego de 24 h de incubación de un sustrato en el rumen, todo P del residuo que sea insoluble en la solución neutro detergente es P bacteriano y el insoluble es P de las bacterias adheridas a las partículas. En este trabajo, el hecho de que los animales que consumían la dieta mixta hayan presentado mayor grado de adherencia a las partículas y desaparición de la MS en el rumen, respecto a los animales que consumían únicamente RTM podría indicar una posible relación entre estas 2 variables, tal como fue descrito en trabajos previos realizados *in vitro* (Prauchner et al., 2013; Farenzena et al., 2013). Aunque, en este caso, no se detectaron variaciones del pH ruminal entre tratamientos, como sí se detectaron en esos mismos trabajos previos.

La actividad enzimática fibrolítica ha sido menos estudiada que la adherencia bacteriana, pero diferentes autores concuerdan en que la actividad de las celulasas es máxima a valores de pH de 6 o inferiores (Russell & Wilson, 1988; Morgavi et al., 2000; Farenzena et al., 2013), mientras que la actividad de la xilanasas sería similar a valores de pH que varían en un rango de 5,5 a 6,5. En este caso, cuando se utilizó forraje como sustrato y se comparó la dieta mixta con la dieta netamente forrajera, se registró un mayor grado de adherencia bacteriana y una tendencia a menor actividad enzimática fibrolítica (de las celulasas, registrado a través de una menor cantidad de azúcares reductores, como producto de la actividad enzimática, por unidad de enzima) en los animales alimentados únicamente con forraje. Estas diferencias fueron halladas

sin detectar diferencias en los valores de pH entre tratamientos (a pesar del mayor valor absoluto encontrado en los animales alimentados solo con forraje).

**En síntesis:** En ovinos alimentados únicamente con forraje fresco, una restricción en el tiempo de acceso al forraje de 6 h por día disminuyó la cantidad de bacterias fibrolíticas y consumidoras de lactato, a pesar de que el pH ruminal no se haya afectado (Experimento Ib). En el mismo sentido, el grado de adherencia bacteriana a las partículas y la actividad enzimática fibrolítica fueron afectados sin que se produjeran cambios en el pH ruminal (Experimento III). Por lo tanto, podríamos pensar que el pH ruminal, por sí solo, no sería de utilidad como parámetro indicador de la actividad fibrolítica como se creía clásicamente. Por otra parte, la adición de compuestos buffers en la dieta de animales alimentados únicamente con forraje fresco en un tiempo restringido no se justificaría. Esto es debido a que el mecanismo de acción de los buffers consistiría básicamente en la dilución del contenido ruminal, a través del mayor consumo de agua de bebida, lo que aumentaría el pH ruminal pero, como se planteó anteriormente, el pH por sí solo no mejoraría la actividad fibrolítica, y de hecho, el uso de buffers no repercutió en la digestibilidad del forraje ni en los niveles de consumo (Experimento Ia). En general, la combinación de un forraje fresco con una RTM, representaría una buena estrategia de alimentación ya que potenciaría la actividad fermentativa sin limitar la capacidad de consumo de los animales. De hecho en los Experimentos II y III, la inclusión de forraje fresco incrementó los niveles de consumo.

## **8. CONCLUSIONES**

Cuando restringimos el tiempo de acceso al forraje fresco a 6 h por día, como único alimento de la dieta de los borregos, la microbiota ruminal se afectó negativamente. Estos cambios se produjeron sin modificaciones del pH ruminal, y podrían tener relación con un tránsito digestivo más acelerado.

La suplementación con una mezcla de 75:25 de  $\text{NaHCO}_3$  y  $\text{MgO}$  a razón de 20 g/kg MSI en borregos sometidos a restricción, generó una menor actividad fermentativa, con menores concentraciones de amoníaco y mayor pH a nivel ruminal. El mecanismo de acción del buffer parecería haber sido la mayor tasa de dilución del rumen derivada de un mayor consumo de agua.

Cuando utilizamos el forraje fresco para suplementar a corderos alimentados con niveles decrecientes de una RTM, no solo no se afectaron negativamente el consumo de nutrientes, digestión y ambiente ruminal, sino que además, aumentó el consumo de nutrientes. Este efecto positivo en el consumo se asoció a un mayor consumo de forraje, debido principalmente a su acción positiva en el comportamiento de los animales.

El mayor ingreso de sustratos para la fermentación al rumen de los animales, a medida que disminuyó el nivel de RTM en la dieta, se acompañó con una menor actividad microbiana evaluada mediante una técnica *in vitro*. Esta contradicción con los resultados obtenidos *in vivo*, reflejaría las posibles limitaciones de la técnica *in vitro*.

La combinación de forraje fresco y RTM en proporciones iguales y en períodos alternados del día aumentó el grado de adherencia de las bacterias a las partículas, lo que se reflejó en una mayor desaparición de MS a nivel ruminal, comparado con los animales alimentados únicamente con RTM. Las diferencias halladas entre tratamientos, no fueron mediadas por cambios en el pH ruminal.

## **9. IMPLICANCIAS**

En los sistemas más intensivos de producción ovina que utilizan forrajes frescos de alta calidad, el empleo de sustancias buffer del tipo  $\text{NaHCO}_3\text{-MgO}$  provocaría una disminución de la actividad fermentativa ruminal y una mayor excreción urinaria de Na, con potencial efecto negativo en el ambiente, por lo cual no se justificaría su utilización.

Sin embargo, en estos sistemas, períodos de pastoreo alternados con el uso de RTM representaría una estrategia interesante. Permitiría mitigar los efectos negativos que se pueden generar en las poblaciones microbianas ante el uso restringido de la pastura, con repercusiones favorables en los niveles de consumo.

Serían necesarios más estudios que integren, además del consumo y la digestión de nutrientes, variables productivas e indicadores de la calidad de la carne en ovinos alimentados con dietas mixtas.

## **10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- A.O.A.C. (1990). Association of Official Analytical Chemist. Official Methods of analysis. 15th ed. AOAC, Arlington VA.
- A.O.A.C. (1997). Official Methods of Analysis, 16rd edn. Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg, MD, USA.
- Adams R.F., Jones R.L., Conway P.L. (1984). High performance liquid chromatography of microbial acid metabolites. *J Chromatogr* 336: 125-137.
- Aguerre M., Cajarville C., Kozloski G., Repetto J.L. (2013). Intake and digestive responses by ruminants fed fresh temperate pasture supplemented with increased levels of sorghum grain: A comparison between cattle and sheep. *Anim Feed Sci Technol*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2013.08.007>.
- Aguerre M. (2010). Suplementación con grano de sorgo a vaquillonas consumiendo una pastura templada: efecto sobre el consumo, el aprovechamiento digestivo y el metabolismo de la glucosa. Tesis de Maestría, Facultad de Veterinaria. UdelaR. 45 p.
- Aguerre M., Repetto J.L., Pérez-Ruchel A., Mendoza A., Pinacchio G., Cajarville C. (2009a). Rumen pH and  $\text{NH}_3\text{-N}$  concentration of sheep fed temperate pastures and supplemented or not with sorghum grain. *S Afr J Anim Sci* 39 (Suppl 1), p. 246-250.

- Aguerre M., Cajarville C., Machado V., Persak G., Bambillasca S., Repetto J.L. (2009b). Dry matter intake and digestibility of wethers and heifers fed temperate pastures supplemented or not with sorghum grain. *S Afr J Anim Sci* 39 (Suppl 1), p. 251-255.
- Alvarez-Rodriguez J.M., Villalba D., Sanz A. (2008). Growth analysis in light lambs raised under different management systems. *Small Rum Res* 79: 188–191.
- Amann R.I., Binder B.J., Olson R.J., Chisholm S.W., Devereux R., Stahl D.A. (1990). Combination of 16SrRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl Environ Microbiol* 56: 1919-1925.
- Annison E.F., Lindsay D.B., Nolan J.V. (2002). Digestion and metabolism. En: *Sheep Nutrition*. Eds. Freer M., Dove H. pp: 95-118.
- Antunez M., Caramelli A. (2009). Variación en la composición química y producción de gas *in vitro* de pasturas de acuerdo al horario de corte. Tesis de Grado, Facultad de Veterinaria. UdelaR. 43p.
- Arcuri P.B., Feraz F.C., Carneiro J.C. (2011). Microbiología do rúmen. En: BerchielliTT, Pires AV, Olivera SG (Eds.), *Nutrição de ruminantes*. 2ª edn. Funep, Jaboticabal, SP, pp. 115-160.
- Aurousseau B. (2007). Indoor fattening of lambs raised on pasture: (1) Influence of stall finishing duration on lipid classes and fatty acids in the longissimus thoracis muscle. *Meat Sci* 76: 241-252.
- Balcells, J., Guada, J.A., Peiró, J.M. (1992). Simultaneous determination of allantoin and oxypurines in biological fluids by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 575, 153-157.
- Banchero G., Ganzábal A., Montossi F., La Manna A., Mieres J., Fernández M.E. (2005). Sitio Argentino de Producción Animal. [http://www.produccionanimal.com.ar/produccion\\_ovina/produccion\\_ovina\\_carne/00\\_produccion\\_ovina\\_carne.htm](http://www.produccionanimal.com.ar/produccion_ovina/produccion_ovina_carne/00_produccion_ovina_carne.htm) (Fecha de consulta: 4/12/2011).
- Bargo F., Muller L.D., Varga G.A., Delahoy J.E., Cassidy T.W. (2002). Ruminal digestion and fermentation of high-producing dairy cows with three different feeding systems combining pasture and total mixed rations. *J Dairy Sci* 85: 2964–2973.
- Bianchi G. (2012). Tecnologías para la carne ovina de calidad como alternativa al cordero pesado, sub-producto del sistema lanero. *Veterinaria (Montevideo)*, 48 (Suppl 1) pp. 19-27.
- Bianchi G., Gariboto G. (2008). Feedlot de corderos: Cuatro años de experiencia en Uruguay. *Revista del Borrego (México)* 50: 26-34.
- Bianchi G., Garibotto G., Fernández M.E., Bentancur O. (2007). Engorde y terminación de corderos (machos criptórquidos y hembras) pesados y super-pesados en confinamiento. *Producción Ovina* 19: 81-82.

- Bianchi G., Gariboto G. (2006). Alternativas genéticas para producir carne ovina en sistemas pastoriles. *Revista Argentina de Producción Animal* 26: 131-153.
- Bianchi G., Garibotto G. (2004). Tecnologías para la producción de corderos pesados fuera de estación. En: *Seminario de Producción Ovina. Propuestas para el negocio ovino*. Paysandú, 29-30 de julio de 2004. SUL. INIAUDELAR (Facultad de Agronomía y Facultad de Veterinaria) e INAC. Paysandú. Uruguay, pp: 36-61.
- Bianchi G., Gariboto G., Peculio A. (2004). El pastoreo de soja como una alternativa para la terminación de corderos en verano. *Revista de EEMAC. Cangue* 27: 26-32.
- Blasina E. (2010). Genes memes y la competitividad de la carne uruguaya. 6° Congreso de Producción, industrialización y comercialización de carne. Del campo al plato. LATU, INIA, INAC.
- Blome R.M., Drackley J.K., McKeith F. K., Hutjens M.F., McCoy G.C. (2003). Growth, nutrient utilization, and body composition of dairy calves fed milk replacers containing different amounts of protein1. *J Anim Sci* 81: 1641–1655
- Bodas R., Frutos P., Giráldez F.J., Hervás G., López S. (2009). Effect of sodium bicarbonate supplementation on feed intake, digestibility, digesta kinetics, nitrogen balance and ruminal fermentation in young fattening lambs. *Spanish J Agric Res* 7: 330-341.
- Borton R.J., Loerch S.C., McClure K.E., Wulf D.M. (2005). Characteristics of lambs fed concentrates or grazed on ryegrass to traditional or heavy slaughter weights. II. Wholesale cuts and tissue accretion. *J Anim Sci* 83: 1345-1352.
- Bowen M.K, Ryan M.P, Jordan D.J, Beretta V., Kirby R.M., Stockman C., McIntyre B.L., Rowe J.B. (2006). Improving sheep feedlot management. *Wool Meets Meat* (eds. Cronjé PB, Maxwell D). Proceedings of the 2006 Australian Sheep Industry CRC Conference, pp. 134-141.
- Brito A.F., Tremblay G.F., Lapierre H., Bertrand A., Castonguay Y., Bélanger G., Michaud R., Benchaar C., Ouellet D.R., Berthiaume R. (2009). Alfalfa cut at sundown and harvested as baleage increases bacterial protein synthesis in late-lactation dairy cows. *J Dairy Sci* 92: 1092–1107.
- Bryant MP, Robinson IM. (1961). Studies on the nitrogen requirement of some ruminant cellulolytic bacteria. *Appl Microbiol* 9: 96.
- Burns J.C., Mayland H.F., Fisher D.S. (2005). Dry matter intake and digestion of alfalfa harvested at sunset and sunrise. *J Anim Sci* 83: 262–270.
- Cajarville C., Pérez A., Aguerre M., Britos A., Repetto J.L. (2006a). Effect of the timing of cut on ruminal environment of lambs consuming temperate pastures. *J Anim Sci* 84, suppl. 1, 103.
- Cajarville C., Aguerre M., Repetto J. (2006b). Rumen pH, NH<sub>3</sub>-N concentration and forage degradation kinetics of cows grazing temperate pastures and supplemented with different sources of grain. *Anim Res* 55: 511–520.

- Cajarville C., Aguerre M., Britos A., Tebot I., Pérez A., Elizondo V., Repetto J.L. (2006c). Effect of feeding frequency of fresh forage on ruminal pH: data review. XIV International Symposium Lameness in Ruminant, Uruguay-Colonia, 7-11 Noviembre, 2006: p. 96.
- Cajarville C., Curbelo A., Errandonea N., Alonso M., Aguerre M., Repetto J.L. (2000). Efecto de la suplementación con diferentes granos sobre el ambiente ruminal de bovinos a pastoreo. I: pH ruminal y cinética de degradación de distintos forrajes. XXI World Buiatrics Congress. Punta del Este: p. 146.
- Carrasco S., Ripoll G., Panea B., Álvarez-Rodríguez J., Joy M. (2009). Carcass tissue composition in light lambs: Influence of feeding system and prediction equations. *Livestock Sci* 126: 112-121.
- Carro M. D., Ranilla M.J. (2002). Los aditivos antibióticos promotores del crecimiento de los animales: situación actual y posibles alternativas. En: [http://www.produccionbovina.com.ar/informacion\\_tecnica/invernada\\_promotores\\_crecimiento/01-aditivos\\_antibioticos\\_promotores.htm](http://www.produccionbovina.com.ar/informacion_tecnica/invernada_promotores_crecimiento/01-aditivos_antibioticos_promotores.htm) (Fecha de consulta: 24/02/2010).
- Castro T., Manso T., Mantecón A.R., Carro M.D. (2002). Effect of either once or twice daily concentrate supplementation of wheat straw on voluntary intake and digestion in sheep. *Small Rum Res* 46: 43–50.
- Chilibroste P., Gibb M., Tamminga S. (2005). Pasture characteristics and animal performance. En: *Dijkstra: Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism*: 681-706.
- Cohen D.C. (2001). Degradability of crude protein from clover herbage used in irrigated dairy production systems in Northern Victoria. *Aust J Agric Res* 52: 415-425.
- Coleman S.W., Henry D.A. (2002). Nutritive value of herbage. En: Freer M., Dove H. (Eds), *Sheep Nutrition*, CAB International, Wallingford, UK: 1-26.
- Czarnocki J., Sibbald I.R., Evans E.V. (1961). The determination of chromic oxide in samples of feed and excreta by acid digestion and spectrophotometry. *Can J Anim Sci* 4, 167-179.
- Da Silva F.C. (1999). Analisis quimicos de tejido vegetal. En: *Manual de análisis quimicos de solos, plantas e fertilizantes*, Embrapa, Brazil, pp.171-204.
- Daims H., Bruhl A., Amann R., Schleifer K.H., Wagner M. (1999). The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all Bacteria: development and evaluation of a more comprehensive probe set. *Syst. Appl Microbiol* 22: 434-444.
- Dalley D.E., Roche J.R., Grainger C. (2001). Effect of grain of buffer supplementation on milk solids yield and rumen fermentation patterns of cows grazing highly digestible herbage in spring. *Proc NZ Soc Anim Prod* 61: 224-228.

- Dedeckere E.A.M., Korver O., Verschuren P.M., Katan M.B. (1998). Health aspects of fish and n-3 polyunsaturated fatty acids from plant and marine organism. *European Journal of Clinical Nutrition*, 52, 749-753.
- Dehority B.A., Tirabasso P.A. (2001). Effect of feeding frequency on bacterial and fungal concentrations, pH, and other parameters in the rumen. *J Anim Sci* 79: 2908-2912.
- Delagarde R., Pérez-Ramírez E., Delaby L., Peyraud J.L. (2008). Adaptation comportementale et ingestion des vaches laitières soumises à une restriction du temps d'accès journalier au pâturage. *Renc Rech Ruminants* 15: 323-326.
- Dewhurst R.J., Shingfield K.J., Lee M.R.F., Scollan N.D. (2006). Increasing the concentrations of beneficial polyunsaturated fatty acids in milk produced by dairy cows in high-forage systems. *Anim Feed Sci Technol* 131:168-206.
- Dhanao M.C., Siddons R.C., France J., Gale J. (1985). A multicompartmental model to describe marker excretion patterns in ruminant faeces. *Br J Nutr* 53: 663-671.
- Dhiman T.R, Nam S.H., Ure A.L. (2005). Factors affecting conjugated linoleic acid content in milk and meat. *Crit Rev Food Sci Nut* 45: 463-482.
- DIEA. (2012). Anuario estadístico agropecuario 2012. Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca, Dirección de Estadísticas Agropecuarias, Uruguay. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/portal/>.
- Dijkstra J., Boer H., Van Bruchem J., Bruining M., Tamminga S. (1993). Absorption of volatile fatty acids from the rumen of lactating dairy cows as influenced by volatile fatty acids concentration, pH and rumen liquid volumen. *Br J Nutr* 69 (2): 385-396.
- Dillon P. (2006). Achieving high dry-matter intake from pasture with grazing dairy cows. En: *Fresh herbage for dairy cattle* (Eds: Elgersma, A., Dijkstra, J., Tamminga, S.). Springer. pp: 1-26.
- Enemark J. (2008). The monitoring, prevention and treatment of sub-acute ruminal acidosis (SARA): A review. *The Veterinary Journal* 176: 32-43.
- Erdman R.A. (1988). Dietary requirements of the lactating dairy cows: A review. *J. Dairy Sci.* 71: 3246-3266.
- Erdman R.A., Hemken R.W., Bull L.S. (1982). Dietary sodium bicarbonate and magnesium oxide for early postpartum lactating dairy cows: effect of production, acid-base metabolism and digestion. *J Dairy Sci* 65: 712-731.
- FAO. (2005). Perspectivas agrícolas, OCDE-FAO, 2005-2014. Capítulo 4. Carne. Tendencias y perspectivas del mercado mundial. <http://www.fao.org/docrep/008/y9492s/y9492s08.htm> (Fecha de consulta: 2/2/2012).
- FAO. (1986). Analytical methods for characterizing feed resources for ruminants. En: *Better utilization of crop residues and by-products in animal feeding: research*

- guidelines 2. A practical manual for research workers. Retrieved October 8, 2007, from <http://www.fao.org/documents/en/detail/27299>.
- Farenzena R., Kozloski G.V., Mezzomo M.P., Fluck A.C. (2013). Forage degradability, rumen bacterial adherence and fibrolytic enzyme activity in vitro: effect of pH or glucose concentration. *Journal of Agricultural Science*, Page 1 of 8 (doi:10.1017/S0021859613000427).
- Fisher D.S., Mayland H.F., Burns J. C. (1999). Variation in ruminant preference for tall fescue hays cut at sundown or sunup. *J Anim Sci* 77: 762–768.
- Fiske C.H.; Subbarov Y. (1925). The colorimetric determination of phosphorus. *Journal of Biological Chemistry* 66: 375-400.
- Fonnesbeck P.V., Christiansen M.L., Harris L.E. (1981). Linear models for calculating digestible energy for sheep diets. *J Anim Sci* 52: 1183-1196.
- Forbes J.M., Mayes R.W. (2002). Food choice. En: Freer M., Dove H. (Eds), *Sheep nutrition*, CAB International, Wallingford, UK, pp. 51-69.
- Fraga M., Perelmuter K., Valencia M.J., Cajarville C., Zunino P. (2013). Caracterización de la microbiota bacteriana ruminal de un bovino a pastoreo mediante técnicas clásicas e independientes de cultivo. *Veterinaria* 49: 40-55.
- Freer M., Dove H., Nolan J.V. (2007). Feed additives. En: Freer M., Dove H., Nolan J.V. (Eds), *Nutrient requirements of domesticated ruminants*, CSIRO Publishing, Collingwood, Australia, pp. 227-233.
- Galbraith H., Miller T.B., Paton A.M., Thompson J.K. (1971). Antibacterial activity of long chain fatty acids and the reversal with calcium, magnesium, ergocalciferol and cholesterol. *J Appl Bacteriol* 34: 803–813.
- Galvani D.B., Pires C.C., Wommer T.P., Oliveira F., Santos M.F. (2010). Chewing patterns and digestion in sheep submitted to feed restriction. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 94: e366–e373.
- García S.C., Santini F.J., Elizalde J.C. (2000). Sites of digestion and bacterial protein synthesis in dairy heifers fed fresh oats with or without corn or barley grain. *J Dairy Sci* 83: 746–755.
- Garibotto G., Bianchi G. (2007). Alternativas nutricionales con diferente grado de intensificación y su efecto en el producto final. Capítulo VI. En: *Alternativas tecnológicas para la producción de carne ovina de calidad en sistemas pastoriles*. Gianni Bianchi. Ed. Hemisferio Sur. pp: 161 – 226.
- Garrett W.N., Meyer J.H., Lofgreen G.P. (1959). The comparative energy requirements of sheep and cattle for maintenance and gain. *J Anim Sci* 18: 528-547.
- Gekara O. J., Prigge E. C., Bryan W. B., Nestor E. L., Seidel G. (2005). Influence of sward height, daily timing of concentrate supplementation, and restricted time for grazing on forage utilization by lactating beef cows. *J Anim Sci* 83: 1435–1444.

- Gibson J.P. (1981). The effects of feeding frequency on the growth and efficiency of food utilization of ruminants: An analysis of published results. *Br Soc Anim Prod* 32: 275-283.
- Gill M. (1979). The principles and practice of feeding ruminants on complete diets. *Grass For Sci* 34: 155-161.
- Grant R.J., Mertens D.R. (1992). Influence of buffer and raw corn starch addition on *in vitro* fiber digestion kinetics. *J Dairy Sci* 73: 1823-1833.
- Grovum B.L., Williams V.J. (1973). Rate of passage of digesta in sheep. *Br J Nutr* 30: 313-329.
- Guedes C.M., Goncalves, D. Rodrigues M.A.M., Dias-da-Silva A. (2008). Effects of a *Saccharomyces cerevisiae* yeast on ruminal fermentation and fibre degradation of maize silages in cows. *Anim Feed Sci Technol* 145: 27–40.
- Hanson G.D., Cunningham L.C., Morehart M.J., Parsons R.I. (1998). Profitability of moderate intensive grazing of dairy cows in the Northeast. *J Dairy Sci* 81: 821-829.
- Hu Z.H., Wang G., Yu H.Q. (2004). Anaerobic degradation of cellulose by rumen microorganisms at various pH values. *Biochemical Engineering Journal* 21: 59–62.
- Jackson J.A., Akay V., Franklin S.T., Aaron D.K. (2001). The effect of cation-anion difference on calcium requirement, feed intake, body weight gain, and blood gasses and mineral concentrations of dairy calves. *J Dairy Sci* 84: 147-153.
- Jacques J., Berthiaume R., Cinq-Mars D. (2011). Growth performance and carcass characteristics of Dorset lambs fed different concentrates: Forage ratios or fresh grass. *Small Rum Res* 95: 113-119.
- Jones E.L., Roberts J.E. (1991). A note on the relationship between palatability and water-soluble carbohydrates content in perennial ryegrass. *Ir J Agric Res* 30: 163–167.
- Kamra DN. (2005). Rumen microbial ecosystem. *Current Sci* 89: 124-135.
- Kawas J.R., García-Castillo R., Fimbres-Durazo H., Garza-Cazares F., Hernández-Vidal J.F.G., Olivares-Sáenz E., Lu C.D. (2007). Effects of sodium bicarbonate and yeast on nutrient intake, digestibility, and ruminal fermentation of light-weight lambs fed finishing diets. *Small Rum Res* 67: 149-156.
- Kennedy E., McEvoy M., Murphy J. P., O'Donovan M. (2009). Effect of restricted access time to pasture on dairy cow milk production, grazing behavior and dry matter intake. *J Dairy Sci* 92: 168–176.
- Khalili H., Sairanen A. (2000). Effect of concentrate type on rumen fermentation and milk production of cows at pasture. *Anim Feed Sci Technol* 84: 199.
- Kohn R.A., Dunlap T.F. (1998). Calculation of the buffering capacity of bicarbonate in the rumen and *in vitro*. *J Anim Sci* 76: 1702-1709.

- Kolver E.S. (2003). Nutritional limitations to increased production on pasture-based systems. *Proc Nut Soc* 62: 291–300.
- Komarek A.R. (1993). A filter bag procedure for improved efficiency of fiber analysis. *J Dairy Sci Champaign* 76 (1) p. 250.
- Kozloski G.V., Cadorin Jr R.L., Härter C.J., Oliveira L., Alves T.P., Mesquita F.R., Castagnino D.S. (2009). Effect of supplemental nitrogen source and feeding frequency on nutrient supply to lambs fed a kikuyu grass (*Pennisetum clandestinum*) hay-based diet. *Small Rum Res* 81: 112–118.
- Kozloski G.V., Lima L.D., Cadorin R.L. Jr, Bonnacarrère Sanchez L.M., Senger C.C. D., Fiorentini G. Härter C. J. (2008). Microbial colonization and degradation of forage samples incubated in vitro at different initial pH. *Anim Feed Sci Technol* 141: 356–367.
- Krause K., Oetzel, G. (2006). Understanding and preventing subacute ruminal acidosis in dairy herds: A review. *Anim Feed Sci Technol* 126: 215-236.
- Krause D.O, Denman S.E, Mackie R.I, Morrison M., Rae A.L., Attwood G.T., McSweeney C.S. (2003). Opportunities to improve fiber degradation in the rumen: microbiology, ecology, and genomics. *FEMS Microbiology Reviews* 27: 663-693.
- Kremer R. (2010). Corderos pesados en Uruguay: evolución e impacto en la producción de carne ovina. *Agrociencias*: 69-71.
- Kristensen T., Oudshoorn F., Munksgaard L., Søgaard K. (2007). Effect of time at pasture combined with restricted indoor feeding on production and behaviour in dairy cows. *Animal* 1: 439–448.
- Lascano G.J., Zanton G.I., Heinrichs A.J. (2009). Concentrate levels and *Saccharomyces cerevisiae* affect rumen fluid-associated bacteria numbers in dairy heifers. *Livestock Sci* 126: 189-194.
- Lee M.R.F., Harris L.J., Moorby J.M., Humphreys M.O., Theodorou M.K., MacRae J.C., Scollan N.D. (2002). Rumen metabolism and nitrogen flow to the small intestine in steers offered *Lolium perenne* containing different levels of water-soluble carbohydrate. *Anim Sci* 74: 587–596.
- Licitra G., Hernandez T.M., Van Soest P.J. (1996). Standardization of procedures for nitrogen fractionation of ruminant feeds. *Anim Feed Sci Technol* 57: 347-358.
- Lourenço M., Van Ranst G., Vlaeminck B., De Smet S., Fievez V. (2008). Influence of different dietary forages on the fatty acid composition of rumen digesta as well as ruminant meat and milk. *Anim Feed Sci Technol* 145: 418-437.
- Manero A., Vilanova X., Cerda-Cuellar M., Blanch A.R. (2006). Vancomycin- and erythromycin-resistant enterococci in a pig farm and its environment. *Environ Microbiol* 8: 667–674.

- Mauricio R.M., Mould F.L., Dhanoa M.S., Owen E., Channa K.S., Theodorou M.K., 1999. A semi-automated *in vitro* gas production technique for ruminant feedstuff evaluation. *Anim. Feed Sci. Technol.* 79: 321-330.
- McDonald P., Edwards R.A., Greenhalgh J.F.D., Morgan C.A. (2006). *Nutrición Animal*. 6a. ed., Acribia. Zaragoza. 587p.
- Mendoza A., Cajarville C., Colla R., Gaudenti G., Martín M.E., Repetto J.L. (2012a). Drymatter intake and behavior patterns of dairy cows fed diets combining pasture and total mixed ration. *J Anim Sci* 90 (Suppl 3): 716.
- Mendoza A., Cajarville C., de la Quintana E., Garmendia M.E., Mutuberría E., de Torres E., Repetto J.L. (2012b). Milk yield and composition of dairy cows fed diets combining pasture and total mixed ration. *J Anim Sci* 90, Suppl 3: 249.
- Mertens D.R. (2003). Challenges in measuring insoluble dietary fiber. *J Anim Sci* 81: 3233-3249.
- Mertens D.R. (2002). Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fibre in feeds with refluxing beakers or crucibles: A collaborative study. *Journal of Association of Official Analytical Chemists* 85: 1217-1240.
- Miller G.L., Blum R., Glennon W.E., Burton A.L. (1960). Measurement of carboxymethyl cellulase activity. *Analytical Biochemistry* 2: 127-132.
- Moorby J.M., Evans R.T., Scollan N.D., MacRae J.C., Theodorou M.K. (2006). Increased concentration of water-soluble carbohydrate in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). Evaluation in dairy cows in early lactation. *Grass and Forage Sci* 61: 52–59.
- Morgavi D.P., Beauchemin K.A., Nsereko V.L., Rode L.M., Iwaasa A.D., Yang W.Z., Mcallister T.A., Wang Y. (2000). Synergy between ruminal fibrolytic enzymes and enzymes from *Trichoderma longibrachiatum*. *J Dairy Sci* 83: 1310–1321.
- Murphy T.A., Loerch S.C., McClure K.E., Solomon M.B. (1994). Effects of grain or pasture finishing systems on carcass composition and tissue accretion rates of lambs. *J Anim Sci* 72: 3138-3144.
- Nielsen S.S. (Ed.). (2003). *Food analysis laboratory manual*. Kluwer Academic/ Plenum Publisherd, Nueva York.
- NRC. (2007). *National Research Council. Nutrient Requirements if small Ruminants*. The National Academies Press, Washington, D.C.
- NRC. (2001). *Nutrient Requirements of Dairy Cattle. 7° Revised Edition*. National Academy Press. Washington D.C.
- NRC. (1996). *Nutrient requirements of beef cattle*. Ed. National Academy Press, 7° ed. Washington D.C., USA.
- Oetzel G.R., Nordlund K.V. (1998). Effect of dry matter intake and feeding frequency on ruminal pH in lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 81: 297.

- Palmonari A., Stevenson D.M., Mertens D.R., Cruywagen C.W., Weimer P.J. (2010). pH dynamics and bacterial community composition in the rumen of lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 93: 279-287.
- Palmquist D.L., Lock A.I., Shingfield K.J., Bauman D.E. (2005). Biosynthesis of conjugated linoleic acid in ruminants and humans. *Adv Food Nut Res* 50: 179-217.
- Park H.G, Heo W., Kim S.B., Kim H.S., Bae G.S., Chung S.H., Seo H.C., Kim Y.J. (2011). Production of Conjugated Linoleic Acid (CLA) by *Bifidobacterium breve* LMC520 and Its Compatibility with CLA-Producing Rumen Bacteria. *J Agric Food Chem* 59: 984-988.
- Pérez-Ramírez E., Peyraud J. L., Delagarde R. (2009). Restricting daily time at pasture at low and high pasture allowance: Effects on pasture intake and behavioral adaptation of lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 92: 3331–3340.
- Pérez-Ruchel A., Repetto J.L., Cajarville C. (2015). Supplementing high quality fresh forage to growing lambs fed a total mixed ration diet led to higher intake without altering nutrient utilization. *Animal*. En revision.
- Pérez-Ruchel A.; Repetto J.L.; Cajarville C. (2014a). Use of NaHCO<sub>3</sub> and MgO as additives for sheep fed only pasture for a restricted period of time per day: effects on intake, digestion and the rumen environment. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 98: 1068-1074.
- Pérez-Ruchel A.; Repetto J.L.; Fraga M.; Perelmuter K.; Zunino P.; Cajarville C. (2014b). La restricción en el tiempo de acceso al forraje en ovinos alimentados con pastura de buena calidad afecta algunos grupos microbianos ruminales. *Veterinaria (Montevideo)*, 50 (194): 22-33.
- Pérez-Ruchel A.; Repetto J.L.; Cajarville C. (2013). Suitability of live yeast addition to alleviate the adverse effects due to the restriction of the time of access to feed in sheep fed only pasture. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 97: 1043 – 1050.
- Pérez-Ruchel A. (2010). Tiempo y forma de acceso al forraje y uso de buffers o levaduras: efecto sobre el aprovechamiento digestivo de la dieta en ovinos. Tesis de Maestría, Facultad de Veterinaria, UdelaR, Uruguay. 100p.
- Pérez-Ruchel A. (2006). pH, Amoníaco, Ácidos Grasos Volátiles y Producción de Proteína Microbiana en el Rumen de Corderos, según el Horario de Corte de la Pastura Consumida. Tesis de Grado, Facultad de Veterinaria. UdelaR. 36p.
- Perkin Elmer (1998). Analytical 100/300 Atomic Absorption Spectrophotometer Hardware Guide, Revision 0993-6088 Rev. E.
- Pernthaler J., Pernthaler A., Amann R. (2003). Automated enumeration of groups of marine picoplankton after fluorescence in situ hybridization. *Appl Environ Microbiol* 69: 2631-2637.
- Piaggio L., Marichal M. de J., Bentancur O., Cor P., Tellechea V. (2013). Producir “Cordero Precoz Pesado” de dos genotipos con engorde a corral y dietas de diferente

- nivel de proteína. XXIII Reunión de la Asociación Latinoamericana de Producción Animal (ALPA).
- Piaggio L. (2010). Suplementación y engorde a corral. Resultados, desafíos. Necesidades de Investigación. *Agrociencias*: 77-81.
- Pomiés N. (2014). Combinación de diferentes niveles de forraje fresco y ración totalmente mezclada en dietas de vacas lecheras: efecto sobre el aprovechamiento digestivo. Tesis de Maestría, Facultad de Veterinaria, UdelaR, Uruguay. 52p.
- Prauchner C.A., Kozloski G.V., Farenzena R. (2013). Evaluation of sonication treatment and buffer composition on rumen bacteria protein extraction and carboxymethylcellulase activity. *J Sci Food Agric* 93: 1733–1736.
- 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.
- Rauch R.E., Robinson P.H., Erasmus L.J. (2012). Effects of sodium bicarbonate and calcium magnesium carbonate supplementation on performance of high producing dairy cows. *Anim Feed Sci Technol* 177: 180-193.
- Reis R.B., Combs D.K. (2000). Effects of increasing levels of grain supplementation on rumen environment and lactation performance of dairy cows grazing grass legume pasture. *J Dairy Sci* 83: 2888-2898.
- Repetto J.L., Pérez-Ruchel A., Gómez X., Aguerre M., Britos A., Cajarville C. (2010). Atividade celulolítica e dinâmica do pH e amônia ruminal em vacas alimentadas com uma forrageira temperada de acordo com o horário de pastejo. 47a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia Salvador, BA – UFBA, 2010.
- Repetto J.L., Cajarville C., D'Alessandro J., Curbelo A., Soto C., Garin D. (2005). Effect of wilting and ensiling on ruminal degradability of temperate grass and legume mixture. *Anim Res* 54: 1-8.
- Repetto J.L., Aguerre M., Alonso M., Curbelo A., Errandonea N., Cajarville C. (2001). Concentración de amoníaco ruminal en vacas a pastoreo, suplementadas con distintos granos. VII Congreso Nacional de Veterinaria. Montevideo, noviembre 2001.
- 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, Montevideo.
- Ritzenthaler K.L., McGuire M.K., Falen R., Shultz T.D., Dasgupta N., McGuire M.A. (2001). Estimation of conjugated linoleic acid intake by written dietary assessment methodologies underestimates actual intake evaluated by food duplicate methodology. *J Nutr* 131: 1548-1554.

- Robertson J.B., Van Soest P.J. (1981). The detergent system of analysis and its application to human foods. In: James, W.P.T.; Theander, O. (Eds). The analysis of dietary fiber in food. Marcel Dekker, NY, USA, pp.123.
- Ruiz A., Mowat D.N. (1987). Effect of feeding frequency on the utilization of high-forage diets by cattle. *Can J Anim Sci* 67: 1067-1074.
- Rushen J., de Passillé A.M., von Keyserlingk M.A.G., Weary D.M. (2008). Housing for adult cattle. En: The welfare of cattle. Springer. Amsterdam, Netherlands, pp. 142-180.
- Russell J.B. (1993) Glucose toxicity in *Prevotella ruminicola*: methylglyoxal accumulation and its effect on membrane physiology. *Applied and Environmental Microbiology* 59: 2844-2850.
- Russell J.B., Chow J.M. (1993). Another theory for the action of ruminal buffer salts: decreased starch fermentation and propionate production. *J Dairy Sci* 76: 826-830.
- Russell J.B., Wilson D.B. (1988). Potential opportunities and problems for genetically altered rumen microorganisms. *Journal of Nutrition* 118: 271–279.
- Santana A., Ubilla J., Berrutti M., Konrath T., Aguerre M., Britos A., Cajarville C., Repetto J.L. (2011). Dry matter intake, ruminal pH and fermentation capacity of rumen fluid in heifers fed temperate pasture, total mixed rations or both. *J Anim Sci* 89 (1): 511.
- Santra A., Chaturvedi O.H., Tripathi M.K., Kumar R., Karim S.A. (2003). Effect of dietary sodium bicarbonate supplementation on fermentation characteristics and ciliate protozoal population in rumen of lambs. *Small Rum Res* 47: 203-212.
- Satter L.D., Slyter L.L. (1974). Effect of ammonia concentration on rumen microbial protein production in vitro. *Br J Nutr* 32: 199-208.
- Senger C.C.D., Kozloski G.V., Bonnacarrère Sanchez L.M., Mesquita F.R., Alves T.P., Castagnino D.S. (2008). Evaluation of autoclave procedures for fibre analysis in forage and concentrate feedstuffs. *Animal Feed Science and Technology* 146: 169-174.
- Sharif M., Shahzad M.A., Nisa M., Sarwar M. (2010). Influence of varying levels of dietary cation anion difference on ruminal characteristics, nitrogen metabolism and *in situ* digestion kinetics in buffalo bulls. *Animal Science Journal* 81: 657-665.
- Silva D.J., Queiroz A.C. (2002). *Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos*. 3ed. Viçosa: UFV. 235p.
- Sniffen C.J., O'Connor J.D., Van Soest P.J., Fox D.G., Russell J.B. (1992). A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: II. Carbohydrate and protein availability. *J Anim Sci* 70: 3562-3577.
- Soder K.J., Rotz C.A. (2001). Economic and environmental impact of four levels of concentrate supplementation in grazing dairy herds. *J Dairy Sci* 84: 2560-2572.

- Steen R.W.J., Porter M.G. (2003). The effects of high concentrate diets and pasture on the concentration of conjugated linoleic acid in beef muscle and subcutaneous fat. *Grass and Forage Sci* 58: 50-57.
- Strobel H.J., Russell J.B. (1986). Effect of pH and energy spilling on bacterial protein synthesis by carbohydrate-limited cultures of mixed rumen bacteria. *J Dairy Sci* 69: 2941-2947.
- Tebot I., Cajaraville C., Repetto J.L., Cirio A. (2012). Supplementation with non-fibrous carbohydrates reduced fiber digestibility and did not improve microbial protein synthesis in sheep fed fresh forage of two nutritive values. *Animal* 6 (4): 617-623.
- Tebot I. (2008). Efecto de los suplementos ricos en energía sobre la función ruminal y el metabolismo del nitrógeno en ovinos alimentados con pasto fresco. Tesis de Maestría, Facultad de Veterinaria. UdelaR. 68p.
- Thomas J.W., Emery R.S. (1969). Additive nature of sodium bicarbonate and magnesium oxide on milk fat concentrations of milking cows fed restricted-roughage rations. *J Dairy Sci* 52: 1762.
- Tripathi, M.K., Santra, A., Chaturvedi, O.H., Karim, S.A. (2004). Effect of sodium bicarbonate supplementation on ruminal fluid pH, feed intake, nutrient utilization and growth of lambs fed high concentrate diets. *Anim Feed Sci Technol* 111: 27-39.
- Udén P., Colucci P.E., Van Soest P.J. (1980). Investigation of chromium, cerium, and cobalt as markers in digesta. Rate of passage studies. *J Sci Food Agric* 31: 625-632.
- von Keyserlingk M.A.G., Rushen J., de Passillé A.M., Weary D.M. (2009). The welfare of dairy cattle -Key concepts and the role of science. *J Dairy Sci* 92: 4101-4111.
- Wales W.J., Marett L.C., Greenwood J.S., Wright M.M., Thornhill J.B., Jacobs J.L., Ho C.K.M., Auld M.J. (2013). Use of partial mixed rations in pasture-based dairying in temperate regions of Australia. *Anim Production Sci* 53: 1167-1178.
- Warren H.E., Scollan N.D., Enser M., Hughes S.I., Richardson R.I., Wood J.D. (2008). Effects of breed and a concentrate or grass silage diet on beef quality in cattle of 3 ages. I: Animal performance, carcass quality and muscle fatty acid composition. *Meat Sci* 78: 256-269.
- Weatherburn M.W. (1967). Phenol-Hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Analytical Chemistry* 39: 971-974.
- Williams B., Bosch M., Boer H., Verstegen M., Tamminga S. (2005). An *in vitro* batch culture method to assess potential fermentability of feed ingredients for monogastric diets. *Anim Feed Sci Technol* 123-124: 445-462.
- Xin Z., Tucker W.B., Hemken R.W. (1989). Effect of reactivity rate and particle size of magnesium oxide on magnesium availability, acid-base balance, mineral metabolism, and milking performance of dairy cows. *J Dairy Sci* 72: 462-470.

Yemm E.W., Willis A.J. (1954). The estimation of carbohydrates in plant extract by anthrone. *Biochem J* 57: 508.

## **11. ANEXOS**