

UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
INSTITUTO DE CIENCIA ANIMAL

**DINÁMICA DE pH y N-NH₃ RUMINALES EN VACAS LECHERAS A PASTOREO
OTOÑAL CON DOS OFERTAS DE PRADERA Y SUPLEMENTADAS CON
CONCENTRADO FIBROSO O AMILÁCEO**

Memoria de Título presentada como parte de
los requisitos para optar al TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO

JORDAN ÁLVARO SOTELO VILLANUEVA

VALDIVIA-CHILE

2010

PROFESOR PATROCINANTE

Dr. Rubén Pulido F.

Nombre

Firma

PROFESOR COPATROCINANTE

Dr. Fernando Wittwer M.

Nombre

Firma

PROFESOR COLABORADOR

Dr. Juan Pablo Smulders R.

Nombre

Firma

PROFESORES INFORMANTES

Dra. Mirela Noro

Nombre

Firma

Dra. Claudia Letelier

Nombre

Firma

FECHA DE APROBACIÓN: 22 de septiembre del 2010

ÍNDICE

Capítulos	Página
1. RESUMEN.....	1
2. SUMMARY.....	2
3. INTRODUCCIÓN.....	3
4. MATERIAL Y MÉTODOS.....	13
5. RESULTADOS.....	19
6. DISCUSIÓN.....	24
7. REFERENCIAS.....	30
8. ANEXOS.....	38

1. RESUMEN

La producción de leche en el sur de Chile se basa, principalmente, en la alimentación de los animales en base a pradera. Sin embargo, el aporte energético no es el suficiente para lograr y mantener máximas producciones, por lo que el suplementar estratégicamente con alimentos concentrados es una práctica común. Sincronizar eficientemente el aporte energético de los concentrados con el aporte proteico de la pradera en otoño, se convierte en una meta para obtener los mejores resultados productivos. El objetivo del presente estudio es generar información de la fermentación ruminal y de la sincronización entre energía y proteína, a través del pH y la concentración de nitrógeno amoniacal (N-NH₃) en el rumen.

Se utilizaron tres vacas fistuladas Frisón Negro con 136 ± 48 días en lactancia, un peso vivo de 497 ± 28 kg y con una producción de leche de $27 \pm 7,5$ litros al inicio del experimento. Los tres animales fueron agrupados siguiendo un diseño factorial de 2×2 . Los efectos evaluados fueron: Oferta de Pradera; Alta Oferta de Pradera (36 kg de MS/día por animal) y Baja Oferta de Pradera (25,5 kg de MS/día por animal) y Tipo de Concentrado; Concentrado Amiláceo (5 kg/día por animal de concentrado en base a maíz) y Concentrado Fibroso (5 kg/día por animal de concentrado en base a coseta de remolacha). Después del período de adaptación, muestras de líquido ruminal fueron obtenidas y el pH medido inmediatamente, luego eran conservadas para el análisis de N-NH₃. El análisis estadístico se realizó con un modelo lineal mixto sobre un diseño factorial de medidas repetidas.

La concentración de N-NH₃ruminal fue superior ($P < 0,05$) en el grupo con baja oferta de pradera ($18,2 \pm 6,0$ mmol/L) que el con alta oferta de pradera ($9,7 \pm 2,2$ mmol/L) y el efecto del tipo de concentrado no influyó en la concentración de N-NH₃ruminal ($P > 0,05$). La oferta de pradera no afectó el valor del pH ($P > 0,05$). Los valores de pH fueron superiores ($P < 0,05$) con el concentrado amiláceo ($6,19 \pm 0,22$) que con el fibroso ($6,07 \pm 0,31$). La interacción entre ambos factores fue significativa para pH y no para N-NH₃ruminal.

Se concluye que una alta oferta de pradera sincronizaría de manera más eficiente la fermentación ruminal, además de que la suplementación con concentrado amiláceo mantendría el valor de pH más elevado que la suplementación con concentrado derivado de la coseta de remolacha.

Palabras claves: pH ruminal, nitrógeno amoniacal, fermentación ruminal, vacas lecheras.

2. SUMMARY

RUMINAL DYNAMICS OF pH AND N-NH₃ IN DAIRY COWS UNDER TWO PASTURE ALLOWANCES, SUPPLEMENTED WITH STARCH OR FIBER BASED CONCENTRATES

Milk production in the South of Chile is based, primarily, in animals' feeding being pasture based. Nevertheless, the energy given to animals through pasture is not enough to achieve and maintain maximum productive levels, therefore supplementing with concentrate feedstuffs is a common practice. Efficient synchronization of the energy and protein input in the diet during autumn is, then, a goal to achieve in order to have the best productive outcome. The objective of the present study is to generate information regarding ruminal fermentation and the synchronization between energy and protein in the diet through ruminal pH, and ammonia nitrogen (N-NH₃) concentration in the rumen.

Three Black Friesian cows fitted with ruminal cannulas (136 ± 48 DIM; live weight: 497 ± 28 kg, milk yield: 27 ± 7,5L/d) were used. They received either a High Pasture Allowance (36 kg DM/d per cow) or Low Pasture Allowance (25.5 kg DM/d) and either Starch Concentrate (5 kg AF) or Beet Pulp Concentrate (5 kg AF) following a 2 x 2 factorial design. After an adaptation period, samples were taken from the rumen and pH was measured immediately, then samples were preserved for ammonia analysis. Statistical analysis was done through a linear mixed model using a factorial design of repeated measures.

Pasture allowance affected ($P < 0.05$) rumen ammonia (N-NH₃) concentration with averages of 9.7 ± 2.2 mmol/L and 18.2 ± 6.0 mmol/L, for high and low pasture allowances, respectively. The effect of type of concentrate did not affect N-NH₃ concentration ($P > 0.05$). pH level was not affected by pasture allowance ($P > 0.05$), whereas the effect of type of concentrate was significant ($P < 0.05$). The averages were 6.19 ± 0.22 and 6.07 ± 0.31 for starch concentrate and beet pulp concentrate, respectively. The interaction of both factors did affect pH value and not ruminal N-NH₃ concentration.

With the results obtained in the study, offering a high pasture allowance to dairy cows would synchronize more efficiently ruminal fermentation, meanwhile the supplementation with starch based concentrate could maintain higher pH levels than beet pulp based concentrates.

Key words: ruminal pH, ammonia, ruminal fermentation, dairy cows.

3. INTRODUCCIÓN

La pradera consumida en pastoreo directo es el principal recurso alimenticio de las vacas lecheras de la Región de los Lagos. Dependiendo del sistema productivo, el pastoreo representa entre el 50 al 75% del consumo anual de materia seca en la mayoría de los casos, con un costo de 1/3 y de 1/8 del de los forrajes conservados y concentrados, respectivamente (Parga 2003).

Esto es gracias a que los rumiantes han adaptado su tracto gastrointestinal anterior para poder degradar celulosa (polímero de glucosa con uniones β 1-4), que es el carbohidrato más abundante del mundo (Van Soest 1994). La fibra necesita de la actividad bacteriana para que sea reciclada y gracias a la ubicación del rumen, previo al intestino delgado, la masa microbiana sintetizada a partir de la fermentación vegetal puede ser aprovechada (Van Soest 1994).

Sin embargo, animales a pastoreo directo no alcanzarían a ingerir las cantidades suficientes de materia seca (MS) y/o energía para poder mantener un alto nivel de producción (Kolver y Muller 1998, Reis y Combs 2000, Bargo y col 2002, Delahoy y col 2003, Klein 2003, Gallardo y col 2005). Incluso, Klein (2003) afirma que vacas de buena aptitud genética, pueden producir sólo 26 L de leche con pérdida mínima de condición corporal cuando son alimentadas sólo de pradera. Empero, las condiciones para que dicha situación se dé es de una pradera con una calidad que sólo se observa, en el sur de Chile, de 4 a 6 semanas durante la primavera.

Por lo anterior, vacas de elevada producción que pastoreen praderas de excelente calidad y alta disponibilidad requieren ser suplementadas para lograr los consumos de MS requeridos para altas producciones de leche, manteniendo una buena salud y reproducción (Klein 2003).

La mayor limitación por parte de las praderas de otoño para sostener dicha producción es el exceso de agua en la planta, escasez de MS, alto contenido de proteína cruda (PC) en relación a la energía (Klein 2003) lo que desencadena desbalances ruminales debido a la asincronía entre los aportes energéticos y proteicos que entran al rumen (Broderick y col 1991).

3.1. ANATOMÍA Y FISIOLOGÍA RUMINAL

Los bovinos son rumiantes que presentan un aparato digestivo formado por cuatro compartimentos, previo al intestino: el rumen, retículo, omaso y abomaso. Las tres primeras partes comprenden los preestómagos o proventrículos y no tienen membrana glandular que cubre el epitelio escamoso estratificado, mientras que el abomaso tiene mucosa glandular (Habely St. Clair 2002). Es en el rumen donde ocurre digestión fermentativa de los alimentos ingeridos por la vaca. En la digestión fermentativa los sustratos moleculares son desdoblados por la acción de las bacterias y de otros microorganismos. Para que ocurra la fermentación el contenido ruminal debe presentar las condiciones de pH, humedad, fuerza iónica y condiciones para la

oxidorreducción favorables para el desarrollo de los microorganismos (Cunningham 1999), además de una velocidad de paso adecuada que permita la acción bacteriana sobre el sustrato.

3.1.1. Poblaciones Microbianas

Las especies microbianas que habitan el retículo rumen son morfológica y funcionalmente diversas, incluyendo bacterias, protozoos y hongos (Baker y Dijkstra 1999).

3.1.1.1. Bacterias

En el rumen se encuentran entre 10^{10} y 10^{11} bacterias por gramo de contenido ruminal. La mayoría de estas bacterias son anaerobias estrictas, a pesar de que existen microorganismos facultativos (Cunningham 1999).

Se puede encontrar más de 30 géneros y 60 especies de las cuales hay 16 géneros y 28 especies que son consideradas importantes en el metabolismo ruminal (Church 1988). Son el grupo de microorganismos más abundante, representan la mitad de la biomasa ruminal y una mayor proporción de la actividad metabólica ruminal (Ørskov 1992).

Las bacterias pueden ser clasificadas de acuerdo al sustrato que fermentan. Así, estos microorganismos pueden ser clasificados como: fermentadores de carbohidratos principalmente (celulosa, hemicelulosa, pectina, almidón y azúcares), fermentadoras de proteínas, péptidos o aminoácidos (aa); y otras que usan dextrinas, pentosas, glucosa, lactato, succinato, formato o hidrógeno como fuentes de energía. Muchas de las especies importantes son altamente especializadas y tienen varios requerimientos específicos para su crecimiento que son suministrados por la fermentación general del rumen (Van Soest 1994). Para una clasificación más extensa ver Hungate (1966^a). Sin embargo, esta clasificación no es absoluta ya que se ha demostrado, por ejemplo, que el 38% de las bacterias son proteolíticas, por lo que bacterias pertenecientes a otro grupo puede degradar la proteína. Esta superposición de sustrato por parte de los diferentes grupos de bacterias hace que la fermentación sea más eficiente y estable, evitando grandes fluctuaciones de los productos finales formados (Church 1988).

Las bacterias pueden ser clasificadas también de acuerdo a su asociación con los sustratos alimenticios que se encuentran en el rumen. Aproximadamente 75% de las bacterias están asociadas con las partículas del alimento y son responsables de la degradación ruminal del alimento (Ørskov 1992). Un segundo grupo más inespecífico se encuentra asociado a la fase líquida y está formado por las bacterias que se han soltado de las partículas y poblaciones con altos ritmos de división que sobreviven gracias a los nutrientes solubles que se encuentran en el líquido ruminal. Por último, existe un grupo anaerobio facultativo que se encuentran en el epitelio del rumen y están encargadas en consumir rápidamente el oxígeno que entra con el alimento y el agua cuando el rumiante los consume. Además tienen gran actividad proteasa y ureasa, interviniendo activamente en el reciclaje de la urea proveniente de fuentes endógenas de urea (Cheng y Costerton 1980).

3.1.1.2. Protozoos

Existe una población grande de protozoarios en el rumen. El número varía entre 10^5 y 10^6 células por gramo de contenido ruminal, siendo la mayoría de las especies ciliadas. Debido al

mayor tamaño de los protozoos con respecto a las bacterias, las masas bacteriana total y protozoaria total son similares (Cunningham 1999).

Los protozoos pueden ser clasificados en dos subclases: *Entodinomorfay Holotrica*(Hungate 1966^b).

La función de los protozoos es algo controversial (Ørskov 1992). Su actividad más relevante es la capacidad de depredar bacterias y algunos componentes sueltos en el medio como almidón y proteína, lo que haría más lenta la fermentación de estos productos dentro del rumen (Van Soest1994).

Sin embargo, los rumiantes pueden vivir defaunados. Entonces, bacterias presentes en el rumen se harían cargo de la actividad de los protozoos que ya no existen, por lo que no habría efectos evidentes (Van Soest1994).

3.1.1.3. Hongos

Se reconoce la presencia de hongos en el rumen y estudios recientes sugieren que pueden desempeñar una función importante en la digestión de las paredes de las células provenientes de las plantas (Cunningham 1999). En dietas forrajeras, pueden representar el 8% de la biomasa ruminal (Orpin 1984). La principal acción de los hongos anaeróbicos encontrados en el rumen es la ayuda en la digestión de la fibra (celulosa y hemicelulosa), además de ser una fuente potencial de nutrientes para el rumiante con dietas de baja calidad (Fonty y Joblin 1991).

3.1.2. Digestión de los carbohidratos en rumen

La estrategia de alimentación de los rumiantes se basa en la simbiosis establecida entre los microorganismos ruminales y el animal huésped; ya que el rumiante contribuye aportando las materias primas o alimentos y las condiciones propicias del medio ruminal como son: temperatura, acidez, anaerobiosis, ambiente reductor entre otros; mientras que las bacterias utilizan parcialmente los alimentos para aprovechar los forrajes los cuales son indigestibles para los mamíferos, con consiguiente aporte de productos de la fermentación con valor nutritivo para el rumiante (ácidos grasos volátiles) y proteína microbiana, sin embargo cuando esta relación simbiótica se altera como consecuencia de cambios en la ración o por factores no deseados se produce un desequilibrio en la población microbiana ruminal que conduce a la aparición de enfermedades (Van Soest 1994).

Los carbohidratos son la principal fuente de energía para los microorganismos ruminales (NRC 2001^a), además son los principales componentes de los tejidos vegetales y constituyen hasta el 50% de la MS de los forrajes, aunque se puede encontrar en concentraciones más elevadas (hasta 80%) en algunas semillas, especialmente en los granos de cereales (Church2004^a).

Desde un punto de vista estructural, los carbohidratos pueden ser clasificados de acuerdo al número de azúcares que su estructura posea. Así, se agrupan en monosacáridos (un azúcar) como las pentosas (arabinosa, xilosa, ribosa) o hexosas (glucosa, fructosa, galactosa, manosa); disacáridos (dos azúcares) como sacarosa, maltosa (glucosa y glucosa con enlaces α 1-4), celobiosa (glucosa y glucosa con enlaces β 1-4) y lactosa (glucosa y galactosa); polisacáridos donde se

encuentran aquellos con enlaces α 1-4 o α 1-6 (amilosa, amilopectina, glucógeno, almidón) o con enlaces β 1-4 como la celulosa; y polisacáridos mixtos como la hemicelulosa (compuesto de 5 o 6 carbonos asociado a ácido urónico en forma de polímero), pectina (polisacárido rico en arabinosa y ácido galacturónico) y gomas (Church 2004^b). Cabe señalar que sólo enzimas microbianas son capaces de destruir enlaces β 1-4 de los glúcidos.

Existe una segunda clasificación de los carbohidratos donde se los clasifica en estructurales (SC) y no estructurales (NSC). Los primeros corresponden a los constituyentes de la pared celular y son la celulosa, hemicelulosa y pectina. Los NSC no forman parte de la estructura vegetal y son, principalmente, azúcares simples, hidratos de carbono de reserva (almidón) y ácidos orgánicos (Van Soest1994).

Desde un punto de vista nutricional, Sniffen y col (1992) clasifican los carbohidratos de acuerdo a su degradación ruminal. Es así que se clasifican en carbohidratos de rápida fermentación (ácidos orgánicos y azúcares libres), de fermentación intermedia que corresponden a los NSC (pectina y almidón), de fermentación lenta que son parte de los SC (celulosa y hemicelulosa) y los que no son degradados (lignina). La diferencia con la clasificación anterior es que se considera que la pectina, componente de la pared celular, se comporta como un NSC en lo referente a la degradación en el rumen.

El contenido de azúcares en la mayoría de las dietas de los rumiantes es bastante bajo, a menos que se suplementen con subproductos de la industria azucarera o pastos frescos y abundantes. El almidón es el principal componente de los granos de cereales y de algunos forrajes. Este es rápidamente digerido en el rumen cuando proviene de alimentos ensilados o granos procesados, en cambio, granos secos pueden contener una cantidad importante de almidón que degrade lentamente. Por otro lado, la pectina no es importante en pastos y granos, pero leguminosas, semillas, pulpa de cítricos y remolacha azucarera contienen cantidades relevantes de pectina (Van Soest1994).

La digestión de los hidratos de carbono en el rumen se divide en dos etapas, la primera consiste en la digestión de los carbohidratos complejos a azúcares más sencillos. Esta acción ocurre gracias a la acción de enzimas bacterianas extracelulares. La celulosa se degrada hasta formar celobiosa que luego es transformada rápidamente a glucosa o glucosa-1-fosfato por una fosforilasa. El almidón es transformado, primero por una amilasa y luego por una maltasa, en glucosa o glucosa-1-fosfato. Los fructanos son atacados por enzimas para formar fructosa, la cual es transformada posteriormente en glucosa y en sacarosa. El principal producto de la degradación de la hemicelulosa son las pentosas, las que pueden ser transformadas en fructosa-6-fosfato o fructosa-1-6-fosfato las que darán como producto piruvato (McDonald 1995). Estos productos de la acción enzimática microbiana no son inicialmente accesibles para el huésped, a pesar de estar libres en la solución, en su lugar, con rapidez son sujetos a un metabolismo posterior por la masa microbiana (Cunningham 1999).

La segunda etapa ocurre a nivel intracelular bacteriana, donde la glucosa entra a la vía metabólica de *Embden-Meyerhof*, que gracias a ser un proceso altamente anaerobio dará como resultado los principales productos finales de la digestión de los carbohidratos en el rumen, que son los ácidos grasos volátiles (AGV) (McDonald 1995). Los tres principales AGV producidos

son el ácido acético, propiónico y butírico, aunque también se producen algunos ácidos volátiles gracias a la desaminación de algunos aa. Dietas ricas en almidón producen proporcionalmente más ácido propiónico (Van Soest 1994). Cuando se redujo el pH ruminal de 6,7 a 6,0 la producción de lactato a partir del almidón fue significativamente mayor, además, la relación con la producción de acetato fue inversa (Strobel y Russell 1986).

Según Tafaj y col (2004) la mayor actividad fermentativa ocurre en el área dorsal del rumen, que es donde se encuentra el material sólido. Esto está relacionado, presumiblemente, a la mayor concentración de sustrato y bacteria en la porción sólida del contenido ruminal, especialmente con bacterias celulolíticas asociadas a partículas del alimento y protozoos.

Los protozoos también juegan un rol en la degradación del almidón (Mackie y col 1978). Estos engullen gránulos de almidón, los fermentan intracelularmente y almacenan el exceso de energía, lo que modularía la tasa de fermentación evitando una rápida degradación por parte de las bacterias, lo que haría descender pronunciadamente el pH ruminal.

La pectina es fermentada por bacterias y protozoarios, dando como producto ácido galacturónico y metanol. El metanol continuaría fermentando lentamente y el ácido galacturónico sería transformado en xilosa por descarboxilación para seguir su degradación hasta AGV (Voigt 1982). Éstas tienen un elevado contenido energético y son fermentadas rápidamente, y su principal producto es el acetato, reduciendo los riesgos de una acidosis (Van Soest 1994). Las bacterias y protozoos que tienen actividad pectinolítica, son sensibles a descensos del pH ruminal ya que no actuarían a pH bajo 6,0 (Strobel y Russell 1986).

El pH en el rumen es un determinante y producto clave de la digestión ruminal. La inclusión del pH en los modelos nutricionales es de suma importancia ya que determina la extensión de la degradación de la materia orgánica, especialmente de la materia orgánica proveniente de la fibra. Sin embargo, en dietas compuestas exclusivamente por forrajes de alta calidad, los valores de pH ruminal encontrados in vivo (5,8 a 6,2) están bajo los niveles en los que modelos como el Cornell Net Carbohydrate and Protein System (CNCPS) consideran como el valor crítico de pH del cual bajo éste, la digestión de la fibra se vería reducida. En el modelo previamente citado, el umbral de pH bajo el cual la digestión de la fibra se vería reducida es de 6,2 mientras que bajo niveles de pH menores a 5,7 no habría digestión de fibra en el rumen. Esta anomalía fue resuelta por De Veth y Kolver (2001) quienes determinaron que en vacas lecheras que recibían dietas compuestas por forraje de alta calidad, los valores de pH ruminal encontrados in vivo están alrededor del valor de pH que es óptimo para la digestión de MS de forraje de alta calidad (6,35) y que el umbral bajo el cual la digestibilidad está reducida es 5,8.

Se describe que existe una gran variabilidad, tanto en el pH como en los productos de la fermentación dentro de un período de 24 horas. La habilidad de predecir el pH ruminal en una dieta es importante para optimizar la digestión ruminal y el aporte de nutrientes para la vaca lechera y para evitar enfermedades ruminales y metabólicas como la acidosis y laminitis (Kolver y de Veth 2002). Cabe señalar que muchos esfuerzos se han invertido en el último tiempo para prevenir la acidosis subaguda en vacas lecheras ya que Keunen y col (2002) determinaron que habría una pérdida de US\$ 1,12 por vaca por día, lo que iría en fuerte detrimento contra las utilidades en una lechería.

3.1.3. Metabolismo del Nitrógeno (N) en el rumen

Los aa que llegan al duodeno de una vaca lechera provienen de la proteína microbiana sintetizada en rumen, proteína no degradada de la dieta y proteína endógena. La proteína microbiana da cuenta de la porción más importante de los aa totales que entran al intestino delgado (NRC 2001^b) y esta necesita de nutrientes específicos, como azufre, ácidos grasos ramificados y minerales traza; sin embargo, bajo la mayoría de los manejos alimentarios de vacas lecheras, estas sustancias no son limitantes. Por lo tanto, el aporte de nutrientes a los microorganismos en el rumen se considera principalmente como la disponibilidad de N y carbohidratos provenientes de la dieta, que se pueden fermentar en el rumen para proveer de esqueletos de carbono y energía en forma de ATP suficientes para la síntesis de proteína microbiana (Stern y col 1994). La concentración de N amoniacal es la suma de la concentración de amoniaco no ionizado (NH_3) y la concentración del ión amonio (NH_4^+) (Visek 1968). Las fuentes de N que salen del rumen hacia el omaso son N amoniacal, proteína no degradable en el rumen y proteína microbiana (Bach y col 2005).

Las estructuras básicas de todos los modelos nutricionales son similares en cuanto a las fuentes de N. Estos son N dietario, reciclado y endógeno. La proteína en la dieta se divide en proteína degradable (PDR) y no degradable en el rumen, y la PDR en fuente de N no proteico y proteína verdadera. La fuente de N no proteico corresponde a N presente en ADN, ARN, nitritos, nitratos, amoniaco y péptidos pequeños que son usados para el crecimiento microbiano (Bach y col 2005).

A medida que la PDR entra al rumen, son atacadas por proteasas microbianas extracelulares, posterior a la adsorción de las bacterias a la proteína (Nugent y Mangan 1981) para formar péptidos de menor tamaño. La tasa y la extensión a la cual la degradación proteica ocurre va a depender de la actividad proteolítica de la microfloraruminal y del tipo de proteína (susceptibilidad y acceso a las uniones peptídicas) (Bach y col 2005). Los factores que afectan la degradación ruminal de las fuentes de N incluyen el tipo de proteína, interacción con otros nutrientes (especialmente carbohidratos dentro de los alimentos y dentro del rumen), tasa de dilución ruminal y la población microbiana predominante en el rumen, la cual es dependiente del tipo de ración, tasa de pasaje ruminal y pH ruminal (Bach y col 2005). Existe un buen número de revisiones donde describen el metabolismo del N en el rumen y como interactúan los factores que determinan la degradación proteica y la síntesis de proteína microbiana (Clark y col 1992, Stern y col 1994, Firkins 1996, Jouany 1996, Wallace 1996, Firkins y col 1998, Bach y col 2005).

Los péptidos originados extracelularmente son absorbidos al interior de los cuerpos celulares microbianos. Dentro de las células bacterianas, los péptidos pueden ser utilizados para producir proteína microbiana o ser degradados todavía más para producir energía a través de las vías de los AGV (Cunningham 1999). Para que esto ocurra, primero el péptido debe ser desaminado para dar lugar al amoniaco y a un esqueleto de carbono, el cual se puede acomodar en varios pasos de la vía de los AGV. Existen algunos microorganismos que no pueden sintetizar sus proteínas a partir de aa preformados. Estas especies lo sintetizan a partir del amoniaco y de varios metabolitos del carbono procedente de la vía de los AGV. Un aspecto importante de la síntesis de proteína microbiana se refiere al hecho de que las bacterias pueden sintetizar todos losaa,

esenciales y no esenciales, de modo que el hospedador obtiene los primeros, independientemente de su presencia en la ración (McDonald 1995).

El pH óptimo de las enzimas proteolíticas del rumen está dentro del rango de 5,5 a 7,0; sin embargo la degradación proteica se reduce en los valores más bajos del pH ruminal, independiente si la dieta es en base a forraje o concentrado (Bach y col 2005). También se describe que, independiente que las bacterias amilolíticas tengan una actividad proteolítica mayor que las bacterias celulolíticas, la degradación proteica fue menor en dietas ricas en concentrados. Además, cuando existe un descenso en el pH ruminal de 6,5 a 5,7; se puede observar una reducción de la concentración de N amoniacal en el rumen sólo en animales alimentados 100% con forraje, mientras que novillos alimentados con 90% de concentrado siempre presentaron menor concentración de N amoniacal, independiente del pH. Por lo tanto, la degradación proteica está determinada no sólo por el pH ruminal, sino que además por el tipo de ración ofrecida, la cual determina la población microbiana ruminal predominante (Bach y col 2005).

Cuando existe exceso de PDR en relación a los requerimientos de los microorganismos ruminales, la proteína es degradada a N amoniacal el cual es absorbido y transportado al hígado para ser metabolizado a urea y, eventualmente, eliminado a través de la orina (Bach y col 2005). Los mecanismos de absorción y modulación del N amoniacal y el reciclaje de urea en rumen no están del todo claros. Sin embargo, existe evidencia suficiente para afirmar que las tasas relativas de transporte de NH_3 y NH_4^+ son dependientes del pH ruminal. El mecanismo de absorción de NH_3 es el de simple difusión a través del epitelio ruminal, lo que ocurre principalmente cuando hay valores de pH ruminal sobre 7,0. A valores de pH ruminal más comunes (6,5 e inferior), el N amoniacal se absorbe principalmente como NH_4^+ a través de canales de K (Abdoun y col 2006). Vale la pena mencionar que el flujo de NH_4^+ a través de canales de K exhibe una interacción competitiva con el K luminal (Abdoun y col 2005) por lo que la absorción de NH_4^+ puede ser reducida con bajos valores de pH ruminal (<6,4) y una alta concentración de K y, probablemente, viceversa (Abdoun y col 2006).

Los microorganismos ruminales pueden usar carbohidratos y proteínas como fuentes de energía para la síntesis de proteína microbiana. Los carbohidratos son la fuente principal de energía para las bacterias, sin embargo también pueden ser usados como esqueletos de carbono para la síntesis de proteína en combinación con N amoniacal. La síntesis de proteína microbiana en el rumen depende del aporte de las cantidades y el tipo adecuado de carbohidratos como fuente de energía para la síntesis de enlaces peptídicos. Carbohidratos que fermentan rápidamente, como almidón y azúcares son más eficientes que otros, como la celulosa, en promover el crecimiento bacteriano (Stern y col 1994).

Además de las cantidades de nutrientes suministradas al rumen, la sincronización a la cual dichos nutrientes se hace disponible para los microorganismos es también importante. Cuando la tasa de degradación de proteínas supera a la de la fermentación de los carbohidratos, grandes cantidades de N pueden perderse en la forma de N amoniacal, e, inversamente, si la velocidad de fermentación de carbohidratos supera a la tasa de degradación de las proteínas, la síntesis de proteína microbiana puede reducirse (Bach y col 2005). A pesar de la solidez teórica de este concepto, es probable que en el ecosistema ruminal, con una amplia mezcla de microorganismos ruminales, ocurra que cuando se ha sincronizado el suministro de nutrientes para una

subpoblación, no esté sincronizada para otra subpoblación (Bach y col 2005). Es por lo anterior que se distinguen las fuentes de N para microorganismos que fermentan uno u otro tipo de carbohidratos. Los microorganismos que fermentan NSC (almidón) utilizan péptidos y aa como su fuente principal de N para la síntesis de proteína ya que su crecimiento es más rápido y tienen mayores requerimientos de mantenimiento; mientras que las bacterias que fermentan carbohidratos estructurales (celulosa) utilizan N amoniacal como su fuente principal de N para la síntesis proteica ya que poseen menores requerimientos de mantenimiento y crecen más lento (Russell y col 1992). En poblaciones microbianas mixtas, se utiliza preferentemente aa libres como fuente de N para la síntesis proteica (Wallace 1996).

3.2. PASTOREO Y SUPLEMENTACIÓN

En las regiones de los Ríos y los Lagos existen cerca de 1,35 millones de hectáreas de praderas; de las cuales un 50% son naturalizadas, un 39% son mejoradas y tan sólo un 11% corresponden a la categoría de sembradas (Teuber y Balocchi 2003). Según Balocchi (1999), alrededor del 45% de la superficie total de praderas de la región se destina a la producción de leche, recurso que constituye la base alimenticia más importante de este rubro en la zona sur. La composición nutricional de otoño de una pradera permanente fertilizada con sequía de la zona de Valdivia durante el verano se presenta en el cuadro 1.

Cuadro 1. Composición química en Base a Materia Seca (BMS) de una pradera permanente de la zona de Valdivia, fertilizada con sequía en verano durante la estación de otoño (Anrique y col 2008).

Pradera	
Variable	X ± D.E.
Materiaseca (%)	17,57 ± 4,41
Cenizastotales (%)	10,36 ± 2,91
Proteínacruda (%)	21,74 ± 5,22
Extractoetéreo (%)	2,69 ± 0,49
Fibracruda (%)	21,0 ± 3,75
Energíametabolizable (Mcal/Kg MS)	2,67 ± 0,25
Fibradetergenteneutro (%)	45,76 ± 7,67
Fibradetergenteácida (%)	25,99 ± 4,76
Calcio (%)	0,63 ± 0,24
Fósforo (%)	0,33 ± 0,05
Magnesio (%)	0,24 ± 0,07
NSC ¹	19,45

¹ Carbohidratos no estructurales = 100 – (PC + EE + FDN + CT) (NRC 2001^a).
D.E.: Desviación Estándar

El suministro de suplementos concentrados en conjunto al pastoreo da a los agricultores del sector lácteo una oportunidad para aumentar la producción por vaca y por unidad de área (Peyraud y col 2004). Es así como el objetivo principal cuando se suplementa vacas lecheras, es aumentar la ingesta total de MS y energía en relación a lo obtenido con dietas solo a pastoreo (Stockdale 2000, Delaby y col 2001, Bargo y col 2003).

Granos molidos y sus subproductos son usados como suplementos, entregados una o dos veces al día y son consumidos solo en algunos minutos. Sin embargo, tanto la cantidad como la tasa de fermentación del suplemento puede afectar el ambiente ruminal y, entonces, la eficiencia de utilización y degradabilidad del forraje. Es más, las fracciones nitrogenadas de las pasturas son rápida y extensamente degradadas en el rumen, produciendo $N-NH_3$, con una tasa de degradación ruminal para las ballicas de 13 a 14%/h, con una degradabilidad instantánea de 6,4 a 11,7% y un 89,3 a 92,9% potencialmente degradable (Beever y col 1986). Se sugiere que granos que contengan carbohidratos fácilmente fermentables mejorarían la incorporación de $N-NH_3$ producido a partir de la pastura, a través de una mejor sincronización (Cajarville y col 2006). El almidón es uno ampliamente utilizado y tiene una tasa de degradación ruminal de 4 a 6,4%/h (Gehman y col 2006).

Subproductos de la industria azucarera, como la coqueta de remolacha, contienen altas cantidades de pectina y representan una alternativa a los granos como fuente de suplementación (Van Soest 1994). La tasa de degradación ruminal de la pectina es de 13%/h en alimentos con 34,5% de fibra detergente neutra (FDN) (Gehman y col 2006).

La literatura nacional es escasa en los que se refiere a la utilización de ambos como fuente de carbohidratos para suplementar vacas a pastoreo otoñal; mientras que la literatura internacional hace más referencia a animales estabulados cuando evalúa el uso de ambas fuentes de carbohidratos en la fermentación ruminal.

Así entonces, la hipótesis general para el presente ensayo es que, la suplementación con concentrado amiláceo o fibroso en vacas lecheras a pastoreo otoñal, recibiendo una alta o baja oferta de pradera, no modifican el pH ni las concentraciones de nitrógeno amoniacal ($N-NH_3$) en el rumen.

3.3. OBJETIVOS

3.3.1. Objetivo general

Generar información sobre parámetros de la fermentación ruminal de vacas a pastoreo otoñal en el sur de Chile a través de la determinación del efecto de dos ofertas de pradera y de dos tipos de concentrado, sobre las variaciones diarias del pH y las concentraciones diarias de $N-NH_3$ en rumen.

3.3.2. Objetivos específicos

Evaluar el efecto del aumento de la oferta de pradera sobre las variaciones diarias del pH y las concentraciones de N-NH_3 en el rumen de vacas lecheras a pastoreo otoñal y suplementadas con dos tipos de concentrados.

Evaluar el efecto de la suplementación con dos tipos de concentrado sobre las variaciones diarias del pH ruminal y las concentraciones de N-NH_3 en vacas lecheras a pastoreo otoñal alimentadas con dos ofertas de pradera.

Evaluar la interacción entre tipos de concentrados y ofertas de pradera sobre las variaciones diarias del pH y las concentraciones de N-NH_3 en el rumen de vacas lecheras a pastoreo otoñal.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 MATERIAL

4.1.1. Ubicación del ensayo

El ensayo se realizó en el predio experimental “Vista Alegre” de propiedad de Universidad Austral de Chile, ubicado a seis kilómetros al norte de la ciudad de Valdivia, Región de los Ríos, Chile. Físicamente, se encuentra entre los paralelos 39°47'46” y 39°48'54” latitud sur y los meridianos 73°13'13” y 73°12'24” longitud oeste, a una altura promedio de 12 metros sobre el nivel del mar. El sitio del ensayo tiene suelos de la serie Valdivia (TypicHapludand), de topografía ligeramente ondulada y sin problemas de drenaje.

4.1.2. Duración del ensayo

El ensayo se realizó desde el 12 de mayo hasta el 7 de julio del 2008.

4.1.3. Animales seleccionados

Se utilizaron tres vacas multíparas de genotipo Frisón Negro Chileno con 136 ± 48 (media \pm D.E.) días en lactancia que disponían de fístula ruminal. Su peso vivo era de 497 ± 28 kg; una condición corporal de $2,7 \pm 0,29$ (escala de 1 a 5); y con una producción de leche de $27 \pm 7,5$ L al inicio del experimento.

4.1.4. Dieta

Las dietas utilizadas durante el ensayo fueron compuestas por los siguientes elementos:

4.1.4.1. Pradera

Principal componente de la dieta de los animales durante el ensayo, compuesta mayoritariamente (90%) por ballica (*Lolium* sp.).

4.1.4.2. Concentrado

Se utilizaron dos concentrados pelletizados, formulados especialmente para este ensayo, uno en base a maíz y, el otro, en base acoseta de remolacha.

4.1.4.3. Agua

Se ofreció *ad libitum* en bebederos fijos durante el camino a la ordeña y muestreo.

4.1.5. Romana y cercos eléctricos

Para la medición de los pesos de los animales durante el experimento, se utilizó una romana con capacidad para 1500 kilogramos con un sensibilidad de 1 kg.

Para delimitar las áreas a pastorear según disponibilidad de pradera, se usaron cercos eléctricos móviles delante y atrás de los animales. Las superficies eran calculadas para que los animales tengan alimento por dos días.

4.1.6. Dispositivo para la medición de la disponibilidad de materia seca en la pradera

Se utilizó un disco marca JENQUIP® (Filip's holding plate pasture meter, New Zealand) para determinar la disponibilidad de materia seca en el potrero y calcular la superficie a ofrecer a los animales.

4.1.7. Peachímetro

Las mediciones del pH se realizaron con un peachímetro portátil (modelo HI 98127, Hanna Instruments Inc., Woonsocket, Rhode Island, 02895, E.E.U.U.) el cual era calibrado con soluciones comerciales de pH 4,0 y 7,0 el día previo al muestreo.

4.1.8. Envases de recolección y almacenamiento de líquido ruminal.

Se utilizaron envases de 200 mL para coleccionar el líquido ruminal filtrado, con 4 capas de gasa cruda, donde se midió inmediatamente el pH.

Se utilizaron envases plásticos de 15 mL para el almacenamiento del líquido ruminal. Para la conservación de las muestras, se utilizó ácido sulfúrico al 1% v/v el cual era adicionado previamente a los tubos plásticos.

4.2. MÉTODOS

4.2.1. Identificación

Los animales fueron identificados con su número de autocrotal.

4.2.2. Diseño experimental

Los animales fueron agrupados en un sólo grupo siguiendo una estructura de experimento con arreglo factorial de 2 x 2. Los efectos evaluados fueron:

- Oferta de pradera:

Alta oferta de pradera: con 36 kg de MS/día por animal.

Baja oferta de pradera: con 25,5 kg de MS/día por animal.

- Tipo de concentrado:

Concentrado amiláceo: suplementación con 5 kg de concentrado en base a maíz.

Concentrado fibroso: suplementación con 5 kg de concentrado en base a coseta de remolacha.

De las interacciones de los factores resultaron 4 tratamientos dietarios:

Tratamiento I (TI): Alta oferta de pradera (36 kg MS/vaca/día) más 5 kg/día de concentrado amiláceo.

Tratamiento II (TII): Baja oferta de pradera (25,5 kg MS/vaca/día) más 5 kg/día de concentrado amiláceo.

Tratamiento III (TIII): Alta oferta de pradera (36 kg MS/vaca/día) más 5 kg/día de concentrado fibroso.

Tratamiento IV (TIV): Baja oferta de pradera (25,5 kg MS/vaca/día) más 5 kg/día de concentrado fibroso.

Los animales eran adaptados a la dieta por 9 días y las muestras eran tomadas el día 10.

4.2.3. Manejo del pastoreo

Los animales se mantuvieron en un sistema de pastoreo rotacional en franjas las que fueron delimitadas con cercos eléctricos móviles, con cambio de éstos cada dos días. La oferta de pradera fue determinada a través del método indirecto de altura comprimida (Canseco y col 2007) con una ecuación lineal de

$$y = ax + b$$

donde, y = disponibilidad de MS (kg/ha)

a = 120

x = lectura del instrumento (disco, diferencia entre primera y última lectura)

b = 350.

Esta ecuación nos revela cuanto hay disponible de pradera, luego hay que determinar el consumo de los animales, para lo cual se usa la siguiente fórmula:

$$CT = 2(A * CE * F)$$

donde, CT = consumo total

A = número total de animales

CE = consumo estimado individual de MS para cada animal, en este caso, consumirán el 3% de su peso vivo aproximado (500 kg).

F = factor determinado previo a las mediciones considerando los residuos de pradera post pastoreo. Estima cuanto más se ofrecerá de pradera por sobre lo estimado, quedando en 1,7 para las dietas con baja oferta de pradera y 2,4 para las dietas con alta oferta de pradera.

Luego, midiendo el ancho del potrero en el cual iban a quedar los animales, se puede determinar la superficie necesaria para cubrir las necesidades de pradera de los animales por dos días de la siguiente manera:

$$X = (10.000 * CT) / y$$

donde, X = metros cuadrados necesarios para satisfacer las necesidades de pradera por parte de los animales por dos días.

CT = consumo total.

y = disponibilidad de MS (kg/ha)

Por último, para determinar el largo de la franja, se utiliza la siguiente ecuación:

$$L = X / a$$

donde, L = largo del potrero.

X = metros cuadrados necesarios para satisfacer las necesidades de pradera por parte de los animales por dos días.

a = ancho del potrero donde se desea colocar los animales.

4.2.4. Composición química de la pradera y concentrado

Muestras de pradera se recolectaron los días que se realizaron los muestreos de líquido ruminal durante el mes de junio y las muestras de los concentrados una vez a la semana durante el período experimental. Estas muestras se analizaron en el laboratorio de Nutrición Animal de la Universidad Austral de Chile.

Se realizó un análisis proximal de Weende, con el objetivo de determinar la concentración de: materia seca (MS), cenizas totales (CT), extracto etéreo (EE) y proteína cruda (PC). La MS se determinó mediante horno de ventilación forzada a 60 °C por 48 horas y estufa a 105°C por 12 horas (Bateman 1970^a). Las cenizas totales se determinaron por calcinación en mufla a 550°C por 5 horas (Bateman 1970^b). El porcentaje de extracto etéreo se determinó en un equipo modelo Goldfish. El porcentaje de proteína cruda se estableció según el método de Micro Kjeldhal (N x 6.25) (Bateman 1970^c). La energía metabolizable (EM) se determinó por regresión a partir del valor “D” (EM=0,279 + 0,0325 * D %) (Garrido y Mann 1981). Determinándose el valor “D” por digestibilidad in vitro por el método de Tilley y Terry modificado (Goering y Van Soest 1972). La concentración de fibra detergente neutro (FDN) y fibra detergente ácido (FDA) se determinó mediante el método de digestión en detergente neutro y digestión con detergente ácido, respectivamente (Van Soest y col 1991).

La determinación de la concentración de calcio (Ca) y magnesio (Mg), se realizó por digestión húmeda con ácidos nítrico y perclórico (espectrofotómetro de absorción atómica), método 975,03 (AOAC 1996). Así también, para la obtención de la concentración de fósforo (P), se utilizó el método vanado molíbdico (calorimétrico) método 22 (AOAC 1980).

4.2.5. Procedimiento para la recolección y análisis de las muestras de líquido ruminal

Durante el día de muestreo se recolectaron muestras de líquido ruminal a las 0800, 0900, 1100, 1300, 1600, 1900, 2100, 2400, 0300, 0600 horas empezando después de la ordeña de la mañana.

Para obtener las muestras de líquido ruminal, se extrajo manualmente contenido ruminal desde tres puntos, el saco dorsal (*Saccus ruminalis dorsalis*), saco ventral (*Saccus ruminalis ventralis*) y saco craneal (*Atrium ruminis, saccus ruminis cranialis*) del rumen (Popesko 1984), luego se mezclaban las tres muestras de contenido ruminal, las cuales fueron tamizadas en 4 capas de gasa cruda. Se obtuvo 150 mL de líquido ruminal, donde el pH fue medido inmediatamente con un peachímetro portátil.

Se acidificaron muestras de 10 mL de líquido ruminal con 2 mL de ácido sulfúrico al 1% v/v por duplicado en tubos de 15 mL. Éstas fueron mantenidas refrigeradas hasta su procesamiento en un laboratorio. Una vez en el laboratorio, las muestras se centrifugaron a 1.400 G a 5°C por 20 minutos. Luego se extrajo el sobrenadante, y se congeló a -20°C para su posterior análisis de N-NH₃ por medio del método de Chaney y Marbach (1962) modificado.

El método consistió en descongelar y extraer 1 mL de muestra en un microtubo y centrifugar a 12.000 RPM por 5 minutos. Se extrajo 0,1 mL del sobrenadante y se le adicionó 0,5 mL de una solución de fenol (0,5 M/L) y nitroprusiato de sodio (0,001 M/L) y una solución de hidróxido de sodio (0,625 M/L) e hipoclorito de sodio (0,03 M/L). Por último se adicionó 4 mL de agua destilada. Con esta combinación de reactivos se catalizó la reacción de indofenol para la determinación de amoníaco, la cual produce un color azul estable (Chaney y Marbach 1962). Este color azul se determina a través de espectrofotometría, calculando la concentración de N amoniacal indirectamente. La absorbancia fue determinada en un espectrofotómetro Spectronic Genesys 5® (Milton Roy, Ivyland, Pensilvania, 18974, E.E.U.U.) a una longitud de onda de 625 nm.

4.2.6. Análisis estadístico

Se utilizó el PROC MIXED® del programa estadístico SAS (Versión 9.1, SAS Institute Inc., 2008) aplicado a un modelo mixto de medidas repetidas. Los efectos fijos que se incluyen en el modelo son el tipo de concentrado, la disponibilidad de la pradera, el tiempo y la interacción de éstos; y el efecto aleatorio fue el animal anidado dentro de cada tratamiento dietario (Wang y Goonewardene 2004). El modelo lineal para este experimento es el siguiente:

$$y_{ijkl} = \mu + C_i + P_j + CP_{ij} + a_k(CP_{ij}) + T_l + CT_{il} + PT_{il} + CPT_{ijl} + e_{ijkl}$$

donde, y_{ijkl} = variable dependiente (pH y N-NH₃),

μ = media general,
 C_i = efecto fijo del tipo de concentrado i -ésimo,
 P_j = efecto fijo de la oferta de pradera j -ésima,
 CP_{ij} = efecto de la interacción entre el tipo de concentrado i -ésimo y la oferta de pradera j -ésima,
 $a_k(CP_{ij})$ = efecto del animal k -ésimo anidado dentro la interacción entre el tipo de concentrado i -ésimo y la oferta de pradera j -ésima,
 T_l = efecto fijo del tiempo de muestreo l -ésimo,
 CT_{il} = efecto de la interacción entre el concentrado i -ésimo y el tiempo de muestreo l -ésimo,
 PT_{jl} = efecto de la interacción entre la oferta j -ésima de pradera y el tiempo l -ésimo de muestreo,
 CPT_{ijl} = efecto de la interacción entre el concentrado i -ésimo, la oferta de pradera j -ésima y el tiempo de muestreo l -ésimo; y
 e_{ijkl} = el error residual del cual se asume una distribución normal, idéntica e independiente con una varianza σ^2 .

La estructura de covarianza escogida para este modelo fue la auto regresiva de primer orden comparando los criterios de información de Akaike, Schwarz y el criterio Bayesiano de Schwarz (Littel 2006).

Diferencias estadísticas fueron declaradas con $P \leq 0,05$ y se utilizó el método de Tukey para comparar entre tratamientos cuando había diferencia en los efectos principales.

5. RESULTADOS

5.1 COMPOSICIÓN NUTRICIONAL DE LOS ALIMENTOS

La calidad de la pradera que recibieron las vacas durante el ensayo presenta un bajo contenido de materia seca (MS), alto contenido de proteína cruda (PC) y bajo contenido de carbohidratos no estructurales (NSC) (Cuadro 2).

Cuadro 2. Composición química en base materia seca (BMS) de la pradera ofrecida a vacas en pastoreo otoñal.

Pradera	
Variable	X ± D.E.*
Materiaseca (%)	12,8 ± 0,7
Cenizastotales (%)	9,7 ± 0,4
Proteínacruda (%)	30,3 ± 2,1
Extractoetéreo (%)	3,4 ± 0,6
Fibracruda (%)	19,7 ± 1,0
Energíametabolizable (Mcal/kg MS)	2,90 ± 0,1
Fibradetergenteneutro (%)	49,2 ± 2,5
Fibradetergenteácida (%)	21,3 ± 1,0
Calcio (%)	0,40 ± 0,02
Fósforo (%)	0,40 ± 0,02
Magnesio (%)	0,20 ± 0,00
NSC ¹	7,4

* n = 4.

¹Carbohidratos no estructurales = 100 – (PC +EE +FDN + CT) (NRC 2001^a).

D.E. : Desviación Estándar

Los alimentos concentrados fueron diseñados para contener similar cantidad de MS, PC y EM, lo que se ve reflejado en el análisis realizado. Las diferencias más importantes se encuentran en fibra detergente neutro y fibra detergente ácido (Cuadro 3).

Cuadro 3. Composición química en base a materia seca (BMS) de los concentrados ofrecidos a vacas en pastoreo otoñal.

Variable	Concentrados	
	Fibroso ² X ± D.E.*	Amiláceo ³ X ± D.E.*
Materiaseca (%)	86,1 ± 0,5	86,1 ± 0,2
Cenizas totales (%)	5,9 ± 0,1	3,4 ± 0,0
Proteína cruda (%)	15,6 ± 0,1	14,6 ± 0,4
Extracto etéreo (%)	1,6 ± 0,1	3,2 ± 0,0
Fibra cruda (%)	13,1 ± 0,1	5,8 ± 0,2
Energía metabolizable (Mcal/Kg MS)	3,26 ± 0,0	3,16 ± 0,0
Fibra detergente neutro (%)	32,4 ± 0,0	18,5 ± 0,5
Fibra detergente ácida (%)	18,3 ± 0,4	7,8 ± 0,3
Calcio (%)	1,2 ± 0,03	0,2 ± 0,02
Fósforo (%)	0,2 ± 0,00	0,3 ± 0,01
Magnesio (%)	0,2 ± 0,00	0,1 ± 0,00
NSC ¹	44,5	60,3

* n = 3.

¹ Carbohidratos no estructurales calculados según NRC (2001^a).

² Concentrado fibroso preparado en base a coseta de remolacha azucarera.

³ Concentrado amiláceo preparado en base a maíz.

5.2. pH RUMINAL

La oferta de pradera no afectó el pH ruminal, a su vez que el concentrado fibroso redujo el valor del pH ruminal ($P < 0,05$). La interacción de ambos factores (tipo de concentrado y oferta de pradera) también fue significativa ($P < 0,05$). El efecto del tiempo sobre el pH fue estadísticamente significativo ($P < 0,001$; Cuadro 4) como se observa al comparar el pH entre diferentes horas del día (Figura 1).

Cuadro 4. Efectos de la oferta de pradera y tipo de concentrado sobre el pH y la concentración de N-NH₃ (mmol/L) ruminal en vacas lecheras a pastoreo otoñal.

Efecto	pH	N-NH ₃ (mmol/L)
Oferta de Pradera		
Alta	6,11 ^a	9,7 ^a
Baja	6,15 ^a	18,2 ^b
Error Estándar	0,035	0,94
Valor de <i>P</i>	0,4632	0,0002
Tipo de Concentrado		
Amiláceo	6,19 ^a	14,1 ^a
Coseta	6,07 ^b	13,9 ^a
Error Estándar	0,035	0,94
Valor de <i>P</i>	0,0362	0,8937
Interacciones		
(Oferta Prad x Tipo Concentrado)	0,0007 (*)	0,8946 (NS)

*: estadísticamente significativo ($P < 0,05$).

NS: no significativo.

^{a,b}: diferentes superescritos dentro de misma columna poseen diferencias estadísticas ($P < 0,05$).

El pH ruminal inicial para ambos tipos de concentrado comienza en valores cercanos al 6,5. Posterior a la ordeña de la mañana, el pH empieza a descender sin que se produzcan diferencias significativas entre el efecto de uno y otro tipo de concentrado, hasta las 1600 horas. Independiente de dicha diferencia, el pH sigue descendiendo hasta alcanzar sus valores más bajos a las 1900. Posterior a esta hora, el pH sube hasta alcanzar valores similares a los de la mañana. Los rangos donde fluctuó el pH a lo largo del día fue de 6,48 y 5,93 cuando las vacas eran suplementadas con concentrado amiláceo; y de 6,48 y 5,72 cuando eran suplementadas con concentrado fibroso (figura 1).

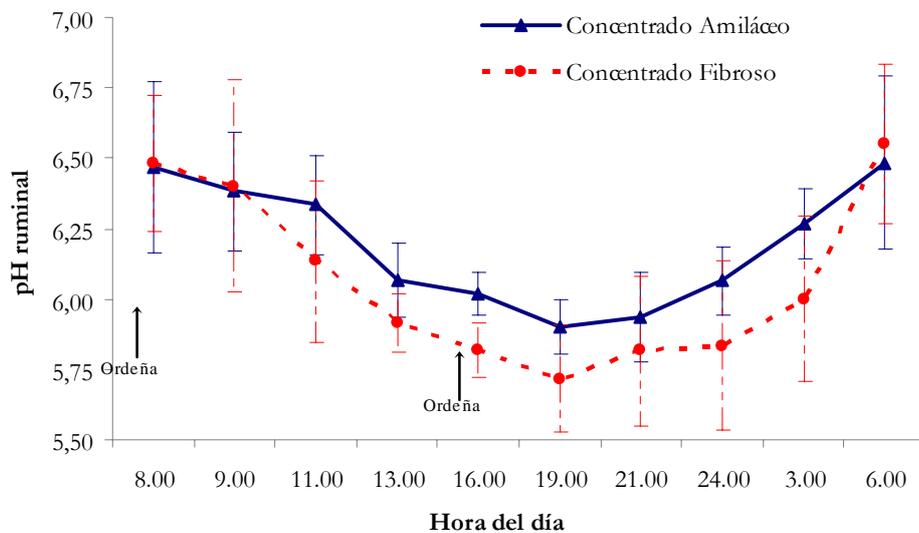


Figura 1. Variación diaria del pH ruminal (media \pm D.E.) en vacas a pastoreo otoñal suplementadas con concentrado amiláceo y concentrado fibroso. Las flechas indican las horas de suplementación con concentrado durante la ordeña.

5.3. CONCENTRACIÓN DE N-NH₃RUMINAL

Cuando los animales recibieron una alta oferta de pradera, la concentración de N-NH₃ fue menor ($P < 0,05$) en comparación a cuando recibieron una baja oferta de pradera. El tiempo también tuvo un efecto significativo sobre la concentración de N-NH₃ruminal ($P < 0,05$) como se puede observar en la figura 2 y comparar entre un horario de muestreo y otro. Por otro lado, el tipo de concentrado y la interacción entre tipo de concentrado y oferta de pradera no tuvo efecto significativo sobre la concentración de N-NH₃ruminal ($P > 0,05$; Cuadro 4).

Las concentraciones de N-NH₃ruminal para ambas ofertas de pradera inician el día con valores similares. A medida que avanza el día, se producen diferencias entre la concentración de

N-NH₃ entre una oferta de pradera y otra, siendo menor cuando recibían una alta oferta de pradera. Entre las 1300 y las 1900 se producen diferencias significativas en las concentraciones de N-NH₃ruminal. Por último, las concentraciones vuelven a valores similares a los de la mañana durante las horas de la noche. Los rangos donde fluctuó la concentración de N-NH₃ruminal a lo largo del día fue de 6,2 y 13,4 mmol/L cuando recibieron una alta oferta de pradera; y de 10,5 y 27,1 mmol/L cuando recibieron una baja oferta de pradera (Figura 2).

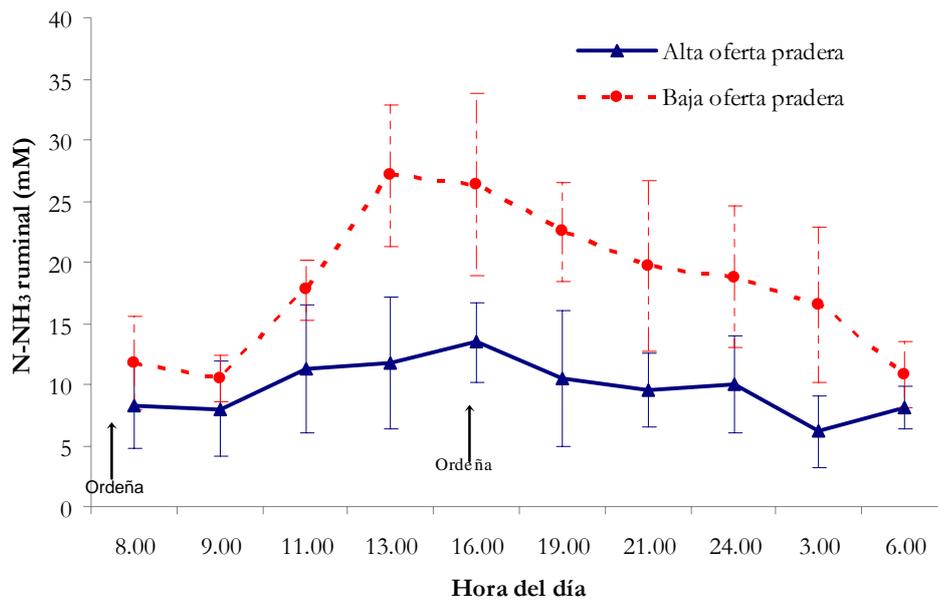


Figura 2. Variación diaria en la concentración de N-NH₃ruminal en vacas a pastoreo otoñal con alta y baja oferta de pradera (media ± D.E.). Las flechas indican las horas de suplementación con concentrado durante la ordeña.

6. DISCUSIÓN

6.1. COMPOSICIÓN NUTRICIONAL DE LOS ALIMENTOS

Los valores para MS, CT, FC, FDA, FDN, EE, Ca y Mg, se encuentran dentro de los rangos descritos para una pradera permanente en el valle central, fertilizada y con sequía de verano, en la Región de los Ríos. En cambio, los valores de PC, EM y P son más altos por 8,56%, 0,24 Mcal/kg y 0,07%, respectivamente (Anrique y col 2008). La PC está correlacionada positivamente con el consumo voluntario de los rumiantes (Minson 1982), sin embargo, una alta cantidad de la misma puede causar desbalances en la fermentación ruminal (Cunningham 1999).

Los aportes nutricionales de los concentrados fueron similares para MS, PC, EM, P y Mg. Los concentrados amiláceos son caracterizados por poseer bajo contenido de fibra y ser rápidamente fermentados en el rumen (NRC 2001^a). Por otro lado, el concentrado derivado de la coseta tiene como principal componente la pectina, carbohidrato altamente digerible que se encuentra normalmente en la pared de la célula vegetal (Van Soest 1994). Existe una gran diferencia entre los aportes de fibra entre uno y otro. El concentrado derivado de la coseta presenta un mayor nivel de FDN (32,4 v/s 18,5%) producto de la fibra digerible que posee en comparación con el maíz.

Las dietas fueron diseñadas para cumplir con los requerimientos nutricionales para vacas de 500 kg con una producción promedio de 25 L al día con un contenido de materia grasa de 3,5% (NRC 2001^b). En un estudio paralelo, Pulido y col (2010) determinó los consumos voluntarios de MS por parte de animales en condiciones similares. Los animales consumieron 15,9 kg de MS/día y 13,9 kg de MS/día cuando recibían una alta y baja oferta de pradera, respectivamente. Teniendo estos valores en consideración, los tratamientos dietarios aportaban 45,5 Mcal y 3931 g de proteína; 41,2 Mcal y 3476 g de proteína; 45,8 Mcal y 3991 g de proteína; y 41,4 Mcal y 3537 g de proteína, para TI, TII, TIII y TIV, respectivamente. Las dietas fueron elevadas en el aporte de proteína para este tipo de vacas (NRC 2001^b), debido al alto contenido de PB encontrado en la pradera de otoño (30,3%), lo que puede conducir a desbalances en la fermentación ruminal.

6.2. OFERTA DE PRADERA

En el cuadro 4 se presentan las medias mínimo cuadráticas de los valores de pH y N-NH₃. El efecto del aumento de la oferta de pradera no tuvo diferencias para pH ruminal, mientras que, al aumentar la oferta de pradera, se redujo las concentraciones de N-NH₃ ruminal a lo largo del día (Figura 2).

Son escasos los estudios a pastoreo otoñal en los que se evaluó el efecto sobre la fermentación ruminal en vacas a pastoreo con diferentes ofertas de pradera (Wales y col 2001, Bargo y Muller 2005). Wales y col (2001) no reportaron diferencias en la concentración de N-NH_3 en el rumen de vacas lecheras a pastoreo primaveral sin suplementación con una oferta alta y baja de *Lolium perenne*, al igual que Bargo y Muller (2005) en vacas con dos ofertas de pradera (25 y 40 kg de MS/día por vaca) y suplementadas con una mezcla de minerales y vitaminas, aunque numéricamente la concentración de N-NH_3 tendió a ser menor en animales con una alta oferta de pradera durante la mañana. En el mismo estudio también se evaluó el efecto de la oferta de pradera sobre la concentración de N-NH_3 ruminal en vacas suplementadas con concentrado (1 kg de concentrado por 4 kg leche producida previo al experimento), donde no se observaron diferencias con respecto a la oferta de pradera sobre la concentración de N-NH_3 en el rumen.

Según Voigt (1982) mantener la concentración de N-NH_3 dentro de un rango de 8,8 a 17,6 mmol/L es lo óptimo para el medio ambiente ruminal, haciendo que la síntesis de proteína bacteriana sea la más eficiente, con lo que la interacción entre las fuentes energéticas y proteicas de la dieta estén en sincronía.

Debido a las características de la pradera durante el ensayo, el alto contenido de PC que presentó la pradera (30,3%, cuadro 2) puede hacer elevar la concentración de N-NH_3 ruminal provocando un exceso del mismo, haciendo más ineficiente la fermentación dentro del rumen, ya que el animal deberá destinar energía para la eliminación de los excesos de N-NH_3 transformándolo en urea y eliminándolo por la orina o la leche (Van Vuuren y col 1992). Sin embargo, Kolver y Muller (1998) proponen que el consumo de praderas de alta digestibilidad de la FDN (praderas succulentas e inmaduras, como en el presente experimento) y suplementadas con una fuente de energía, permiten una alta síntesis de proteína microbiana en rumen y disminuyen la concentración de N-NH_3 , en comparación con vacas sin suplementación (Strauch 2003).

En el presente ensayo, se logró mantener una concentración de N-NH_3 ruminal dentro de un rango de 8,8 a 17,6 mmol/L (Voigt 1982) con una alta oferta de pradera (Figura 2), donde los valores a lo largo del día se movieron dentro de un rango de 5,9 a 14,7 mmol/L. Por otro lado, cuando recibieron una baja oferta de pradera, aumentó la concentración de N-NH_3 ruminal después de la ordeña de la mañana para mantenerse sobre los 17,6 mmol/L la mayor parte del día y, hacia la tarde, descender a valores similares a los que comenzaba en la mañana.

Suplementar vacas a pastoreo con concentrados mejoraría la utilización de amoníaco en el rumen, sincronizando la disponibilidad de energía y proteína en dicho compartimento (Van Vuuren y col 1991, Noro y col 2006), lo que se ve reflejado en una menor concentración sanguínea de urea (DePeters y Ferguson 1992). En un estudio paralelo al presente, Barrientos (2008) determinó el efecto de dos ofertas de pradera y dos fuentes de carbohidratos suplementados en dicha variable en vacas en condiciones similares a este estudio, encontrando que las concentraciones plasmáticas de urea estaban sobre los rangos de referencia, evidenciando un exceso de proteína cruda en la dieta ofrecida a los animales. Esto confirma el hecho de que las concentraciones de amoníaco en rumen también se encuentran sobre el rango previamente señalado (Voigt 1982). Sin embargo, los resultados sobre los efectos de la oferta de pradera no

fueron tan claros como en el presente donde existe una diferencia significativa en la concentración de amoníaco ruminal (cuadro 4) entre los grupos con baja o alta oferta de pradera.

Kolver y col (1998) afirmaron que animales que recibían N de forraje fresco y eran suplementados de forma sincronizada con carbohidratos tuvieron una media diaria de pH ruminal menor junto con presentar una menor concentración de N-NH₃ruminal. Si bien en el presente experimento no hubo diferencias significativas al aumentar la oferta de pradera, el pH fue numericamente menor para dietas que tuvieron una alta oferta de pradera, además de presentar una mejor sincronización entre los aportes energético y proteicos al rumen, reflejados por una menor concentración de N-NH₃ruminal (Kolver y col 1998). De la misma manera, los promedios de pH de 6,11 y 6,15 cuando los animales recibieron una alta o baja oferta de pradera respectivamente, son valores esperables en animales alimentados en base a pradera, ya que el rango de pH donde la digestibilidad de FDN está sobre el 60% es de 6,0 y 6,6, con un pH óptimo para la degradación de la materia orgánica de forrajes de alta calidad de 6,35, y sólo con valores de pH bajo 5,8 se vería reducida la digestibilidad de FDN (De Veth y Kolver 2001).

Los resultados obtenidos en este experimento son explicados por la diferencia en el aporte energético de las dietas, en particular, de lo entregado por la pradera. En un estudio paralelo se estimó el consumo voluntario diario de MS por parte de las vacas con las mismas dietas (Pulido y col 2010). Cuando se asignaba una alta oferta de pradera, los animales consumieron, en promedio, 11,1 kg de MS/díade pradera, más 4,3 kg MS/díade concentrado. Con baja oferta de pradera, los animales consumieron 9,6 kg de MS/día, más 4,3 kg de MS/día, en pradera y concentrado, respectivamente. Al calcular los aportes de proteína cruda de la dieta se observa que fue prácticamente al doble en comparación con los requerimientos para vacas de las características del estudio (2525 g de PB v/s 3961 y 3507 g de PB para alta y baja oferta de pradera, respectivamente) (NRC 2001^a). Por otro lado, el aporte energético cuando recibieron una alta oferta de pradera fue de 45,65 Mcal/día mientras que cuando recibían una baja oferta de pradera fue de 41,3 Mcal/día, en promedio. Aparentemente, esta diferencia de 4,35 Mcal se traduciría en una mayor síntesis de proteína bacteriana por parte de los animales en tratamientos con alta oferta de pradera, haciendo que los microorganismos captaran más N-NH₃ del medio ruminal. Esta mayor capacidad de captación de N-NH₃haría disminuir la concentración del mismo, obteniendo una mejor sincronía entre el aporte proteico y energético en la dieta. Por otro lado, el exceso de PB en los diferentes tratamientos junto con una menor cantidad de energía metabolizable en los tratamientos dietarios con una baja oferta de pradera, haría que los microorganismos ruminales no tuvieran acceso suficiente a ATP generado de la vía de *Embden-Meyerhof* para poder sintetizar aa y péptidos a la misma velocidad que el amoníaco se va produciendo en el rumen, a partir de la PB que ingresa con la dieta. Esto haría que se acumule N-NH₃en el rumen, lo que explicaría la concentración elevada obtenida en el presente ensayo con los tratamientos dietarios con baja oferta de pradera (NRC 2001^b).

6.3. TIPO DE CONCENTRADO

En el cuadro 4 se presentan las medias mínimo cuadráticas de los valores de pH y N-NH₃ruminal cuando se sustituía concentrado en base a maíz por concentrado en base a coseta de

remolacha. La concentración de $N-NH_3$ no presentó diferencias mientras que el pH fue menor cuando los animales recibieron concentrado fibroso.

Llama la atención este resultado ya que en la revisión realizada por Bargo y col (2003) sobre los efectos de los carbohidratos en relación al pH ruminal, no reportó diferencias en los valores de pH ruminal cuando vacas lecheras eran suplementadas con distintas fuentes de carbohidratos. La alimentación con granos de cereales (almidón) normalmente desencadena una sucesión ecológica en el rumen, que tiene como resultado una fermentación en que la producción de ácidos y otros productos, que pueden exceder la capacidad absorptiva y digestiva del animal, se acumulan disminuyendo el pH (Chengy col 1991). Por otro lado, una suplementación con concentrado alto en FDN digestible induciría un patrón de fermentación diferente, más lento y menos ácido, efecto que se buscó con la suplementación con coseta de remolacha. Sin embargo, Bargo y col (2003) citan varios ensayos donde se comparó la fuente de los carbohidratos en la dieta (almidón v/s fibra) y su efecto sobre el pH. En dichos ensayos se utilizaron distintas fuentes de almidón (maíz, tapioca, cebada, trigo y avena) y diferentes fuentes de fibra altamente digestible (remolacha y remolacha más pulpa de cítricos). Las conclusiones informadas fueron que la suplementación con concentrados en base a fibra, comparándolos con concentrados en base a almidón, no afectaron el pH ruminal de vacas lecheras a pastoreo suplementadas con cantidades moderadas (aproximadamente 5 kg de MS/día) o altas (aproximadamente 10 kg MS/día) de concentrado.

Abrahamse y col (2008) estudiaron el efecto del tipo de forraje y el tipo de concentrado sobre el consumo inmediato de MS, tomando como uno de los parámetros la fermentación ruminal. Para esto utilizó 5 dietas diferentes en las que combinaba concentrados de origen fibroso y amiláceo, con ensilaje de maíz y de pradera. Sólo en dietas con alto contenido de almidón (> 25% BMS) obtenido con una dieta rica en NSC (concentrado amiláceo más ensilaje de maíz) se logran obtener diferencias estadísticamente significativas entre los promedios de pH ruminal durante el día. De la misma manera, es con este tipo de dietas que se obtiene un mayor tiempo bajo un pH de 5,8 ocasionando cuadros de acidosis subaguda. Explica que no hubo diferencias entre las medias de los otros tratamientos debido a una diferencia en el consumo diario de MS, el cual fue mayor en el último tratamiento, incrementando el flujo total de nutrientes hacia el rumen, lo que se tradujo en un menor pH y en un mayor tiempo de éste bajo 5,8, a pesar de que la cantidad de materia orgánica y energía digestible no difirieron con los otros tratamientos.

Las variaciones de pH encontradas en este ensayo coincidieron con un perfil típico de una curva de pH ruminal, es decir, con un pico previo a la primera suplementación con concentrado para luego descender hasta los valores más bajos aproximadamente 12 horas después de la primera suplementación (Nocek y col 2002). Incluso animales que sufrieron desafíos sucesivos para desencadenar acidosis ruminal subclínica (SARA) presentaron un perfil de la curva similar, aunque con valores de pH más bajos (Krause y col 2009). Sin embargo, existen antecedentes de una curva bifásica para animales a pastoreo, con un segundo pico aproximadamente 8 horas posterior a la alimentación de la mañana, atribuyéndosela a la rumia del animal durante el día lo que haría aumentar el pH hacia la tarde, para luego descender posterior a la segunda ordeña donde los animales tendrían acceso a concentrado, y de esa manera, carbohidratos de fermentación rápida (Pulido y col 2006). Yang y Beauchemin (2009) obtuvieron curvas similares a las obtenidas por Pulido y col (2006), en un ensayo con vacas estabuladas que recibían el

alimento tres veces al día (0600, 1500 y 1800). Los valores más altos de pH fueron obtenidos previo a la alimentación de las 0600 y las 1500 y se explican por la ausencia de alimento previo a estas horas ya que los comederos eran limpiados y los animales estaban rumiando. Incluso, este tipo de curva ha sido obtenida en sistemas de cultivo continuo con doble flujo cuando se ha querido emular en un laboratorio el rumen (Wales y col 2009). En el presente estudio, si bien no se evidenció una fluctuación de dichas características para los tratamientos dietarios individuales, TI, TII y TIV (Anexo 1) siguieron disminuyendo su pH posterior a la suplementación de la tarde, incluso acelerando la tasa a la que el pH disminuía cuando entraba concentrado (materia orgánica) al sistema.

La concentración de N-NH₃ no fue alterada por el cambio en el tipo de concentrado probablemente debido a que las dietas fueron isoenergéticas e isoproteicas cuando recibieron uno u otro concentrado de acuerdo a los valores obtenidos por Pulido (2010) para consumo diario de MS. Así pues, los animales comían 44,33 Mcal y 3840 g de PB al día y 43,31 Mcal y 3730 g de PB al día cuando eran suplementados con un concentrado amiláceo o fibroso, respectivamente. Además, el hecho que los valores de pH se movieran dentro de rangos de 6,5 y 5,8, haría que el N-NH₃ se encuentre en su forma ionizada (NH₄⁺) lo que haría que la absorción de este compuesto esté determinada por la capacidad de los canales de K en el epitelio ruminal de absorberlo (Abdoun 2007), o de la capacidad de las bacterias de absorberlo para la síntesis de proteína microbiana (NRC 2001^b). Algunos autores afirman que bacterias celulolíticas absorben N en forma de N-NH₃ para su síntesis de aa y proteínas (Russell y col 1992), por lo que se hubiese esperado que la concentración de N-NH₃ hubiese sido menor en animales suplementados con carbohidratos ricos en FDN, sin embargo en el presente experimento no ocurrió.

El valor menor del pH ruminal observado al usar concentrados de origen de coseta de remolacha en comparación con uno de almidón de maíz obtenido en este experimento puede ser explicado por la diferencia de la dinámica de fermentación de cada compuesto. El almidón presente en el concentrado amiláceo es hidrolizado rápidamente a maltosa (Van Soest 1994) que es disociada en glucosa o en glucosa-1-fosfato por bacterias amilolíticas. Los fragmentos que resultan de la disociación del almidón son aprovechados por las bacterias no amilolíticas y protozoos para la síntesis microbiana de polisacáridos (Voigt 1982). Este patrón de fermentación hace que ocurra un pronunciado descenso del pH posterior a la ingesta del mismo, pudiendo tener un efecto negativo sobre bacterias celulolíticas (Russell y Wilson 1996) al alcanzar valores de pH bajo 5,8 por un prolongado periodo de tiempo provocando cuadros de acidosis subagudas (Krause y col 2003). Sin embargo, esto ocurriría sólo cuando la producción de AGV derivados del almidón sobrepase la capacidad absorptiva y tampón por parte del rumen para estos compuestos (Firkins y col 2001), situación que no se habría dado con los aportes de concentrado que se ofrecieron.

La coseta de remolacha posee como carbohidrato principal la pectina que es degradada rápidamente en un principio, para luego mantenerse en el medio por más tiempo, debido al balance entre su degradación y la liberación y uso del ácido galacturónico (Hoover y Stokes 1991). Los principales productos de la fermentación de la pectina por parte de bacterias y protozoos en el rumen, son el ácido galacturónico y el metanol. El ácido galacturónico es transformado en xilosa la cual es fermentada para producir AGV. El metanol continúa fermentando lentamente (Voigt 1982), lo que podría desencadenar un efecto acumulativo del

mismo en el rumen cuando están siendo alimentados con alimentos ricos en pectina, pudiendo hacer que el pH alcance valores inferiores que los descritos para el almidón. Clark (1992) sugirió que bajos aportes de fibra efectiva (25 a 50% de FDN) y FDN rápidamente fermentable puede explicar bajos valores de pH (5,4 a 5,8) en vacas a pastoreo. Además, Miron y col (2004) describieron un aumento en el número de comidas y tiempo ocupado comiendo en animales suplementados con concentrados ricos en FDN en comparación con concentrados de almidón, lo que podría provocar una mayor cantidad de materia orgánica potencialmente fermentable en el rumen, aumentando la producción total de AGV, haciendo que el pH sea menor con este tipo de suplementos. Sin embargo, Pulido y col (2010) en un ensayo de pastoreo con condiciones similares a la de este experimento, no encontraron diferencias en el consumo de MS total en animales suplementados con concentrado amiláceo (almidón) o fibroso (coseta de remolacha).

6.4. CONCLUSIONES

En vacas lecheras a pastoreo otoñal suplementadas con concentrado, al aumentar la oferta de pradera no se modifica el valor del pH ruminal, pero disminuye la concentración de N-NH₃ruminal.

En vacas lecheras a pastoreo otoñal con dos ofertas de pradera, el uso del concentrado fibroso, disminuye el valor del pH ruminal pero no modifica la concentración de N-NH₃ruminal comparado con un concentrado amiláceo.

En vacas lecheras a pastoreo otoñal, la interacción entre la oferta de pradera y el tipo de concentrado suplementado modifica el pH ruminal sin modificar la concentración de N-NH₃ruminal.

7. REFERENCIAS

- Abdoun K, F Stumpff, K Wolf, H Martens. 2005. Modulation of electroneutral Na transport in sheep rumen epithelium by luminal ammonia. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 289, G508–G520.
- Abdoun K, F Stumpff, H Martens. 2006. Ammonia and urea transport across the rumen epithelium: a review. *Anim Health Res Rev* 7, 43-59.
- Abrahamse P, B Vlaeminck, S Tamminga, J Dijkstra. 2008. The effect of silage and concentrate type on intake behavior, rumen function, and milk production in dairy cows in early and late lactation. *J Dairy Sci* 91, 4778-4792.
- Anrique R. R Fuchslocher, S Iraira, R Saldaña, 2008. Tablas de composición de alimentos. En: Anrique R. R Fuchslocher, S Iraira, R Saldaña (eds). *Composición de alimentos para el ganado bovino*. 3ª ed. Imprenta América Ltda., Valdivia, Chile, Pp 17-62.
- AOAC. 1980. 7. Animal Feed. In: Horowitz W (ed). *Official methods of analysis of the association of official analytical chemists*. 13th ed. AOAC, Washington D.C., USA, Pp 125-142.
- AOAC. 1996. Animal Feed. En: *Official Methods of Analysis of AOAC International*. 16th ed. AOAC International, Gaithersburg, Maryland, USA, Pp 74-117.
- Bach A, S Calsamiglia, MD Stern. 2005. Nitrogen metabolism in the rumen. *J Dairy Sci* 88, E9-E21.
- Baker SK, J Dijkstra. 1999. Dynamic aspects of the microbial ecosystem of the reticulo-rumen. En: Jung HJG, GC Fahey (eds). *Nutritional ecology of herbivores: proceedings of the Vth international symposium on the nutrition of herbivores*. 1st ed. American Society of Animal Science, Savoy, IL, E.E.U.U., Pp 261-311.
- Balocchi O. 1999. Recursos forrajeros más utilizados. *Agroanálisis*. 184, 37- 40.
- Bargo F, LD Muller, JE Delahoy, TW Cassidy. 2002. Performance of high producing dairy cows with three different feeding systems combining pasture and total mixed rations. *J Dairy Sci* 85, 2948-2963.
- Bargo F, LD Muller, ES Kolver JE Delahoy. 2003. Invited review: production and digestion of supplemented dairy cows on pasture. *J Dairy Sci* 86, 1-42.
- Bargo F, LD Muller. 2005. Grazing behavior affects daily ruminal pH and NH₃ oscillations of dairy cows on pasture. *J Dairy Sci* 88, 303-309.

- Barrientos L. 2008. Evaluación metabólica de vacas en lactancia temprana pastoreando pradera de otoño con alta o baja disponibilidad y suplementadas con concentrado amiláceo o fibroso. *Memoria de título*, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Austral de Chile, Chile.
- Bateman J. 1970. La materia seca. En: Bateman J (ed). *Nutrición animal manual de métodos analíticos*. 1ª ed. Editorial Herrero Hermanos Sucesores S.A., México D.F., México, Pp 123-145.
- Bateman J. 1970. La ceniza. En: Bateman J (ed). *Nutrición animal manual de métodos analíticos*. 1ª ed. Editorial Herrero Hermanos Sucesores S.A., México D.F., México, Pp 146-149.
- Bateman J. 1970. La proteína. En: Bateman J (ed). *Nutrición animal manual de métodos analíticos*. 1ª ed. Editorial Herrero Hermanos Sucesores S.A., México D.F., México, Pp 150-194.
- Beever DE, MS Dhanoa, HR Losada, RT Evans, SB Campbell, J France. 1986. The effect of forage species and stage of harvest on the processes of digestion occurring in the rumen of cattle. *Br J Nutr* 56, 439-454.
- Broderick GA, RJ Wallace, ER Ørskov. 1991. Control of rate and extent of protein degradation. *Proceedings of the Seventh International Symposium on Ruminant Physiology*, Sendai, Japan, Pp 541-592.
- Cajarville C, M Aguerre, JL Repetto. 2006. Rumen pH, N-NH₃ concentrations and forage degradation kinetics of cows grazing temperate pastures and supplemented with different sources of grain. *Anim Res* 55, 511-520.
- Canseco C, R Demanet, O Balocchi, J Parga, V Andwandter, A Abarzúa, N Teuber, J Lopetegui. 2007. Determinación de la disponibilidad de materia seca de praderas en pastoreo. En: Teuber K N, O Balocchi L, J Parga M (eds). *Manejo del pastoreo, proyecto FLA*. 1ª ed. Imprenta América, Osorno, Chile, Pp 23-49.
- Chaney A, EP Marbach. 1962. Modified reagents for determination of urea and ammonia. *Clin Chem* 8, 130-132.
- Cheng KJ, JW Costerton. 1980. Adherent rumen bacteria: their role in the digestion of plant material, urea and epithelial cells. En: Ruckesbusch Y, P Thivend (eds). *Digestive physiology and metabolism in ruminants*. 1st ed. Editorial MTP press, Lancaster, Inglaterra, Pp 227-250.
- Cheng K, CW Forsberg, H Minato, JW Costerton. 1991. Microbial ecology and physiology of feed degradation within the rumen. *Proceedings of the Seventh International Symposium on Ruminant Physiology*, Sendai, Japan, Pp 595-624.
- Church CD. 1988. Microbiología del rumen. En: Church CD (ed). *El rumiante, fisiología digestiva y nutrición, volumen 1, Fisiología digestiva*. 1ª ed. Editorial Acribia, Zaragoza, España, Pp 184-225.

- Church DC. 2004. El aparato digestivo y la nutrición. En: Church DC, WG Pond (eds), KR Pond. *Fundamentos de la nutrición y alimentación de animales*. 2ª ed. Editorial Limusa S.A., México D.F., México, Pp 31-48.
- Church DC. 2004. Glúcidos. En: Church DC, WG Pond (eds), KR Pond. *Fundamentos de la nutrición y alimentación de animales*. 2ª edición, Editorial Limusa S.A., México D.F., México, Pp 101-114.
- Clark JH, TH Klusmeyer, MR Cameron. 1992. Microbial protein synthesis and flows of nitrogen fractions to the duodenum of dairy cows. *J Dairy Sci* 75, 2304-2323.
- Cunningham JG. 1999. Digestión: procesos fermentativos. En: Cunningham JG (ed). *Fisiología veterinaria*. 2ª ed, McGraw-Hill Interamericana, México D.F., México, Pp 373-406.
- Delaby L, JL Peyraud, R. Delagarde. 2001. Effect of the level of concentrate supplementation, herbage allowance and milk yield at turn-out on the performance of dairy cows in mid lactation at grazing. *Anim. Sci.* 73, 171-181.
- Delahoy JE, LD Muller, F Bargo, TW Cassidy, LA Holden. 2003. Supplemental carbohydrates sources for lactating dairy cows on pasture. *J Dairy Sci* 86, 906-915.
- De Peters EJ, JD Ferguson. 1992. Nonprotein nitrogen and protein distribution in the milk of cows. *J Dairy Sci* 75, 3192-3209.
- De Veth M J, E S Kolver. 2001. Diurnal variation reduces digestion and synthesis of microbial protein when pasture is fermented in continuous culture. *J Dairy Sci* 84, 2066-2072.
- Firkins JL. 1996. Maximizing microbial protein synthesis in the rumen. *J Nutr* 126, 1347S-1354.
- Firkins JL, MS Allen, BS Oldick, NR St-Pierre. 1998. Modeling ruminal digestibility of carbohydrates and microbial protein flow to the duodenum. *J Dairy Sci* 81, 3350-3369.
- Firkins JL, ML Eastridge, NR St-Pierre, SM Noftsker. 2001. Effect of grain variability and processing on starch utilization by lactating dairy cattle. *J Anim Sci* 79, E218-E238.
- Fonty G, KN Joblin. 1991. Rumen anaerobic fungi: their role and interactions with other rumen microorganisms in relation to fiber digestion. *Proceedings of the Seventh International Symposium on Ruminant Physiology*, Sendai, Japan, Pp 655-680.
- Gallardo MR, AR Castillo, F Bargo, AA Abdala, MG Maciel, H Perez-Monti, HC Castro, ME Castelli. Monensin for lactating dairy cows grazing mixed-alfalfa pasture and supplemented with partial mixed ration. *J Dairy Sci* 88, 664-652.
- Garrido O, E Mann. 1981. Composición química, digestibilidad y valor energético de una pradera permanente de pastoreo a través del año. *Memoria de título*, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.

- Gehman AM, JA Bertrand, TC Jenkins, BW Pinkerton. 2006. The effect of carbohydrate source on nitrogen capture in dairy cows on pasture. *J Dairy Sci*89, 2659-2667.
- Goering, H.K., and P.J. Van Soest. 1970. Forage fiber analysis (apparatus, reagents, procedures, and some applications). *USDA AgricHandb* 379.
- Habel RE, LE St. Clair. 2002. Sistema digestivo de los rumiantes. En: Grossman JD, S Sisson (eds). *Anatomía de los animales domésticos*. 5^a ed. Editorial Masson S.A., Barcelona, España, Pp 957-1016.
- Hoover WH, SR Stokes. 1991. Balancing carbohydrates and proteins for optimum rumen microbial yield. *J Dairy Sci*74, 3630-3644.
- Hungate RE. 1966. The rumen bacteria. En: Hungate RE (ed). *The rumen and its microbes*. 1st ed. Academic Press, New York, USA, Pp 8-90.
- Hungate RE. 1966. The rumen protozoa. En: Hungate RE (ed). *The rumen and its microbes*. 1st ed. Academic Press, New York, USA, Pp91-147.
- Jouany JP. 1996. Effect of rumen protozoa on nitrogen utilization by ruminants. *J Nutr*126, 1335S-1346.
- Klein F. 2003. Utilización de praderas y nutrición de vacas a pastoreo. En: Teuber N, M Uribe, R Opazo (eds). *Seminario hagamos de la lechería un mejor negocio, Serie Actas N°24*, Instituto de Investigación Agropecuaria, Centro Regional de Investigación Remehue, Osorno, Chile, Pp41-54
- Kolver ES, LD Muller. 1998. Performance and nutrient intake of high producing Holstein cows consuming pasture or a total mixed ration. *J Dairy Sci* 81, 1403-1411.
- Kolver E, LD Muller, GA Varga, TJ Cassidy. Synchronization of ruminal degradation of supplemental carbohydrate with pasture nitrogen in lactating dairy cows. *J Dairy Sci*88, 2017-2028.
- Kolver E S, M J de Veth. 2002. Prediction of ruminal pH from pasture-based diets. *J Dairy Sci* 85, 1255-1266.
- Krause KM, DK Combs, KA Beauchemin. 2003. Effects of increasing levels of refined cornstarch in the diet of lactating dairy cows on performance and ruminal pH. *J Dairy Sci*86, 1341-1353.
- Krause K, DV Dhuyvetter, GR Oetzel. 2009. Effect of low moisture buffer block on ruminal pH in lactating dairy cattle induced with subacuteruminal acidosis. *J Dairy Sci* 92, 352-364.

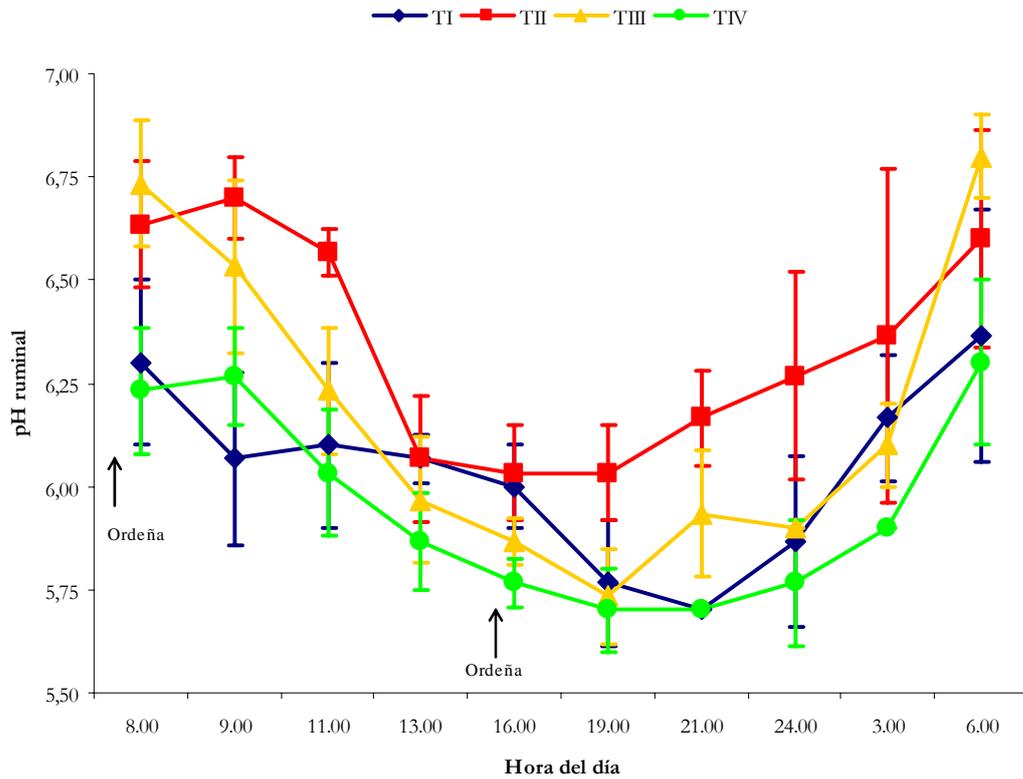
- Littel R. 2006. Analysis of repeated measures data. En: Littel R, G Milliken, W Stroup, RWolfinger, O Schabenberger (eds). *SAS[®] for Mixed Models*. 2nded. SAS Publishing, SAS Institute Inc., North Carolina, USA, Pp 159-203.
- Mackie RI, FMC Gilchrist, AM Roberts, PE Hannah, HM Schwartz. 1978. Microbiological and chemical changes in the rumen during the stepwise adaptation of sheep to high concentrate diets. *J AgricSciCamb* 90, 241-250.
- McDonald P. 1995. Digestión. En: McDonald P (ed). *Nutrición Animal*.5^a ed. Editorial Acribia S.A., Zaragoza, España, Pp 131-161.
- Minson DJ. 1982. Effects of chemical and physical composition of herbage eaten upon intake. En: Hacker JB (ed.). *Nutritional limits to animal production from pastures*. 1st ed. Commonwealth Agricultural Bureaux, Farnham Royal, Great Britain, Pp 167-182.
- Miron J, E Yosef, M Nikbachat, A Zenou, E Maltz, I Halachmi, D Ben-Ghedalia. 2004. Feeding behaviour and performance of dairy cows fed pelleted nonroughage fiber byproducts. *J Dairy Sci* 87, 1372-1379.
- National Research Council. 2001. Carbohydrates. En: National Research Council (eds). *Nutrient Requirements of Dairy Cattle*. 7th rev. ed. National Academy Press, Washington D.C., USA, Pp 34-42.
- National Research Council. 2001. Protein and amino acids. En: National Research Council. (eds). *Nutrient Requirements of Dairy Cattle*. 7th rev. ed. National Academy Press, Washington D.C., USA, Pp43-104.
- National Research Council. 2001. Nutrient requirement tables. En: National Research Council (eds). *Nutrient Requirements of Dairy Cattle*. 7th rev. ed. National Academy Press, Washington D.C., USA, Pp258-280.
- Nocek E, J Allman W Kautzt. 2002. Evaluation of an indwelling ruminal probe methodology and effect of grain level on diurnal pH variation in dairy cattle. *J DairySci*85, 422-428.
- Noro M, V Vargas, RG Pulido, F Wittwer. 2006. Efecto del tipo de concentrado sobre los indicadores del metabolismo de energía y de proteínas en vacas lecheras en pastoreo primaveral. *Arch Med Vet* 38, 227-232.
- Nugent JHA, JL Mangan. 1981. Characteristics of the rumen protelysis of fraction I (18S) leaf protein from Lucerne (*Medicago sativa* L). *Br J Nutr*46, 39-58.
- Orpin CG. 1984. The role of ciliate protozoa and fungi in the rumen digestion of plant cell walls. *Anim Feed SciTechnol*10, 121-143.
- Ørskov ER. 1992. Rumen microorganisms and their nutrition. En: Ørskov ER (ed). *Protein nutrition in ruminants*. 1st ed. Academic Press Limited, London, United Kingdom, Pp 20-42.

- Parga M J. 2003. Utilización de praderas y manejo de pastoreo con vacas lecheras. En: Teuber N, M Uribe, R Opazo (eds). *Seminario hagamos de la lechería un mejor negocio, Serie Actas N°24*, Instituto de Investigación Agropecuaria, Centro Regional de Investigación Remehue, Osorno, Chile, Pp 23-41.
- Peyraud JL, R Mosquera-Losada, L Delaby. 2004. Challenges and tools to develop efficient dairy systems based on grazing: How to meet animal performance and grazing management. *Proceedings of the 20th General Meeting of the European Grassland Federation*, Luzern, Switzerland. Pp 373-384
- Popesko P. 1984. Toro, divisiones del preestómago y del estómago. En: Popesko P (ed). *Atlas de anatomía topográfica de los animales domésticos, Tomo II – Tronco*. 1^a ed. Salvat Editores S.A., Mallorca, España, Pp 53.
- Pulido R, I Gebauer, M Leiva, F Wittwer. 2006. Nivel de suplementación en vacas lecheras a pastoreo primaveral. II evaluación del pH y nitrógeno amoniacal en líquido ruminal. Presentado en: XX Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias en Santiago, Chile el día 14 de noviembre del 2006.
- Pulido RG, R Muñoz, C Jara, OA Balocchi, JP Smulders, F Wittwer, P Orellana, M O'Donovan. 2010. The effect of pasture allowance and concentrate supplementation type on milk production performance and dry matter intake on autumn-calving dairy cows in early lactation. *LivestSci* 132, 119-125.
- Reis RB, DK Combs. 2000. Effect 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.
- Russell JB, JD O'Connor, DG Fox, PJ Van Soest, CJ Sniffen. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: I. Ruminant fermentation. *J AnimSci* 70, 3351-3561.
- Russell JB, DB Wilson. 1996. Why are ruminal cellulolytic bacteria unable to digest cellulose at low pH?. *J Dairy Sci* 79, 1503-1509.
- SAS Institute Inc. 2004. SAS/STAT Users Guide, release 9.1. SASInstitute Inc., Cary, NC.
- Sniffen CJ, JD O'Connor, PJ Van Soest, DG Fox, JB Russell. 1992. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: II. Carbohydrate and protein availability. *J AnimSci* 70, 3562-3577.
- Stern MD, GA Varga, JH Clark, JL Firkins, JT Huber, DL Palmquist. 1994. Evaluation of chemical and physical properties of feeds that affect protein metabolism in the rumen. *J Dairy Sci* 77, 2762-2786.

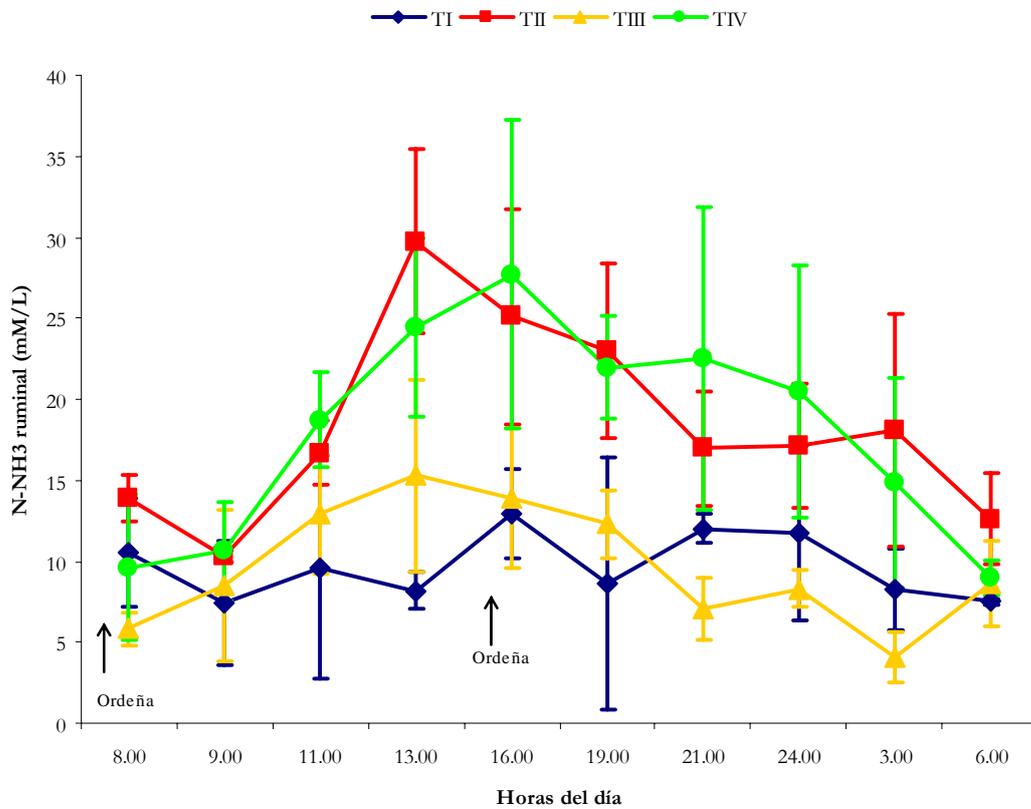
- Stockdale CR. 2000. Levels of pasture substitution when concentrates are fed to grazing dairy cows in northern Victoria. *AustJExpAgric*40, 913-921.
- Strauch M. 2003. Efecto de la suplementación con dos tipos de carbohidratos en el concentrado sobre la síntesis de proteína microbiana, en vacas en pastoreo primaveral. *Memoria de título*, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Austral de Chile, Chile.
- Strobel HJ, JB Russell. 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.
- Tafaj M, W Drochner, B Junck, A Maulbetsch, H P Piepho, H Steingass. 2004. Digesta characteristics of dorsal, middle and ventral rumen of cows fed with different hay qualities and concentrate levels. *ArchAnimNutr* 58, 325-342.
- Teuber N, O Balocchi. 2003. Recursos forrajeros en producción de leche. I. Balance alimenticio con los recursos del sur. En: Teuber N, M Uribe, R Opazo (eds). *Seminario hagamos de la lechería un mejor negocio, Serie Actas N°24*, Instituto de Investigación Agropecuaria, Centro Regional de Investigación Remehue, Osorno, Chile, Pp1-12.
- Van Vuuren AM, S Tamminga, RS Ketelaar. 1991. In sacco degradation of organic matter and crude protein of fresh grass (*Loliumperenne*) in the rumen of grazing cows. *J AgricSci* 116, 429-439.
- Van Vuuren A, F Krol-Kramer, RA van der Lee, H Corbijn. 1992. Protein digestion and intestinal amino acids in dairy cows fed fresh *Loliumperenne* with different nitrogen contents. *J Dairy Sci*75, 2215-2225.
- Van Soest PJ, J Robertson, B Lewis. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J DairySci*74, 3583-3595.
- Van Soest PJ. 1994. Carbohydrates. En: Van Soest PJ (ed). *Nutritional ecology of the ruminant*. 2nded. Comstock Publishers, Ithaca, NY, USA, Pp 156-176.
- Visek WJ. 1968. Some aspects of ammonia toxicity in animal cells. *J DairySci*51, 286-295.
- Voigt J. 1982. Digestión y metabolismo de los carbohidratos. En: Piatkowski B (ed). *El aprovechamiento de los nutrientes en el rumiante*. 1^a ed. Editorial Hemisferio Sur, Buenos Aires, Argentina, Pp 129-214.
- Wallace J. 1996. Ruminant metabolism of peptides and amino acids. *J Nutr* 126, 1326S-1334.
- Wales WJ, PT Doyle, YJ Williams. 2001. Effect of grain supplementation and the provision of chemical or physical fibre on marginal milk production responses of cows grazing perennial ryegrass pasture. *Aust J ExpAgric*41, 465-471.

- Wales W, ES Kolver, AR Egan. 2009. Digestion during continuous culture fermentation when replacing perennial ryegrass with barley and steam flaked corn. *J Dairy Sci* 92, 189-196.
- Wang Z, LA Goonewardene. 2004. The use of MIXED models in the analysis of animal experiments with repeated measures data. *Can J Anim Sci* 84, 1-11.
- Yang W, KA Beauchemin. 2009. Increasing physically effective fiber content of Dairy cow diets through forage proportion versus forage chop length: Chewing and ruminal pH. *J Dairy Sci* 92, 1603-1615.

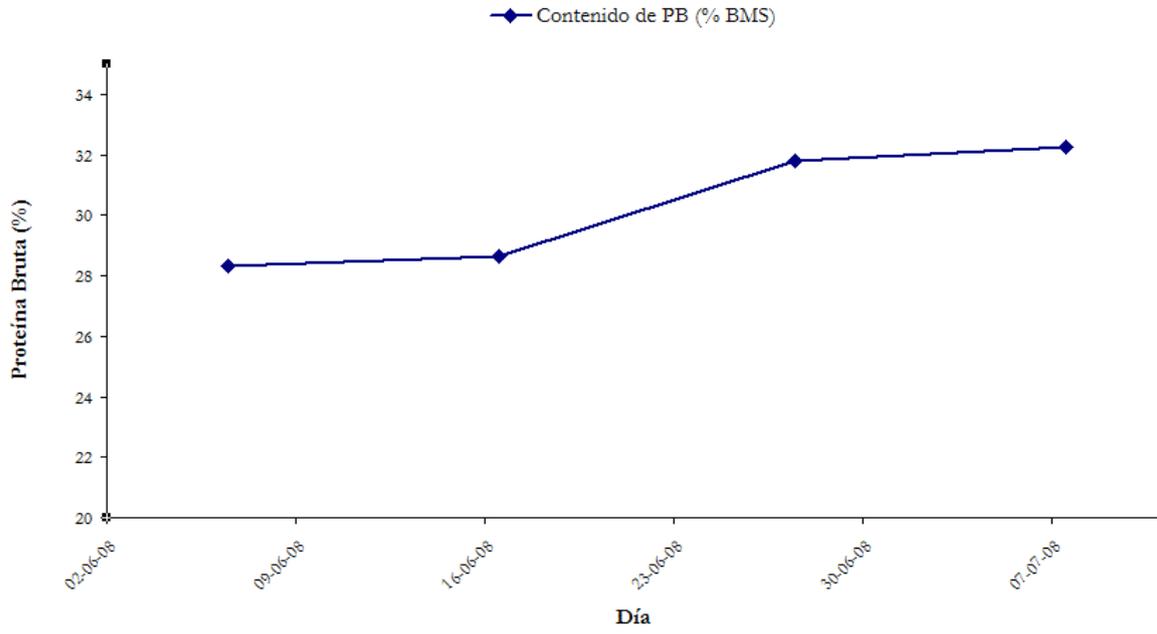
8. Anexos



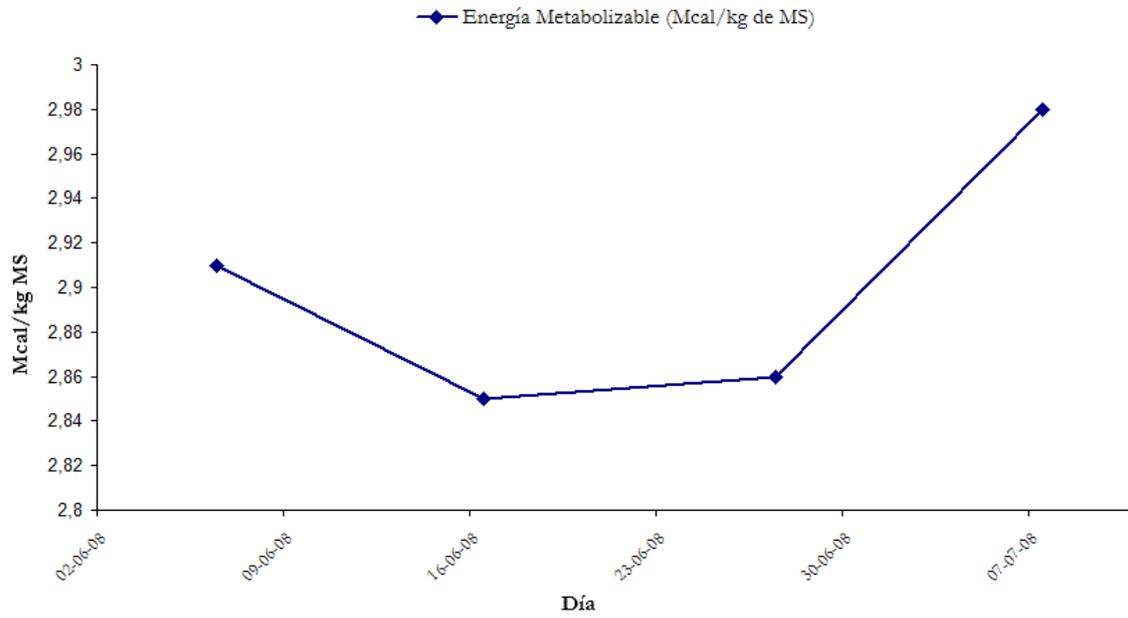
Anexo 1. Variaciones diarias de pH ruminal (media \pm D.E.) en vacas lecheras a pastoreo otoñal con dos ofertas de pradera y dos tipos de concentrado. TI, concentrado amiláceo más alta oferta de pradera; TII, concentrado amiláceo más baja oferta de pradera; TIII, concentrado fibroso más alta oferta de pradera; TIV, concentrado fibroso más baja oferta de pradera; las flechas indican las horas de suplementación con concentrado (ordeñas).



Anexo 2. Variaciones diarias de la concentración de N-NH₃ ruminal (media \pm D.E.) en vacas a pastoreo otoñal con dos ofertas de pradera y dos tipos de concentrado. TI, concentrado amiláceo más alta oferta de pradera; TII, concentrado amiláceo más baja oferta de pradera; TIII, concentrado fibroso más alta oferta de pradera; TIV, concentrado fibroso más baja oferta de pradera; las flechas indican las horas de suplementación con concentrado (ordeña).



Anexo 3. Contenido de PB (% de MS) de la pradera ofrecida durante el período experimental.



Anexo 4. Contenido de EM (Mcal/kg de MS) de la pradera ofrecida durante el período experimental.