

**UTILIZACIÓN DE SUBPRODUCTOS AGROINDUSTRIALES EN RACIONES
COMPLETAMENTE MEZCLADAS PARA VACAS LECHERAS**

Francisco José Javier Stefañuk Bahamonde

Trabajo de Tesis para ser presentado como
requisito parcial para optar al Título de

MAGISTER EN PRODUCCIÓN ANIMAL

Área de posgrado en Producción y Sanidad Animal

PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS AGRARIAS

**FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
UNIVERSIDAD NACIONAL DE MAR DEL PLATA**

Unidad Integrada Balcarce: Facultad de Ciencias Agrarias, UNMdP – Estación
Experimental Agropecuaria Balcarce, INTA

Balcarce, ARGENTINA

Marzo de 2014

**UTILIZACIÓN DE SUBPRODUCTOS AGROINDUSTRIALES EN RACIONES
COMPLETAMENTE MEZCLADAS PARA VACAS LECHERAS**

Francisco José Javier Stefañuk Bahamonde

Daniel A., Garciarena Ing. Agr., M. Sci.,
Director de Tesis

Susana Guaita Ing. Agr., M. Sci.
Asesora

Delfina Montiel Ing. Agr., M. Sci., Dr.
Asesora

**UTILIZACIÓN DE SUBPRODUCTOS AGROINDUSTRIALES EN RACIONES
COMPLETAMENTE MEZCLADAS PARA VACAS LECHERAS**

Francisco José Javier Stefañuk Bahamonde

Aprobada por:

Evaluador Héctor H. Fernández Ing. Agr., M. Sci.

Evaluador Darío Colombatto Ing. Agr., Ph. D.

Evaluador José Arroquy Ing. Agr., Ph. D.

DEDICATORIA

Esta tesis está dedicada a Sol por su paciencia, comprensión y aguante...

AGRADECIMIENTOS

A Daniel, Susana y Delfina por su paciencia y generosidad.

A Héctor, Darío y José por su tiempo y dedicación.

A Marita por su apoyo y consejos.

A Graciela y Nely por recibirme en Balcarce y hacerme sentir como en mi casa.

A Cristian, Roberto, Miguel, Maximiliano, Roxana, Marta, Marina y Adriana gracias por su excelente trabajo y compañerismo.

A los compañeros del posgrado por los buenos momentos vividos.

Al Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria y a la empresa COMPAL por los aportes económicos que financiaron el presente trabajo.

ÍNDICE

DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTOS.....	v
ÍNDICE	vi
ÍNDICE DE TABLAS.....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
LISTADO DE ABREVIATURAS	xii
RESUMEN.....	xvi
ABSTRACT	xvii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Hipótesis general.....	14
1.2. Objetivo general.....	14
1.3. Objetivos específicos.....	14
2. EVALUACIÓN DE RACIONES EN VACAS LECHERAS.....	16
2.1. Materiales y métodos.....	16
2.1.1. Lugar y fecha.....	16
2.1.2. Tratamientos.....	16
2.1.3. Animales y diseño experimental.....	17
2.1.4. Análisis químicos de las raciones completamente mezcladas.....	18
2.1.5. Alimentación y consumo de materia seca de las vacas.....	19
2.1.6. Producción y composición de leche de las vacas.....	19
2.1.7. Estimación del peso vivo, balance energético y proteico de las vacas.....	19
2.1.8. Metabolitos y hormonas plasmáticas de las vacas.....	20
2.1.9. Análisis estadístico.....	21
2.2. Resultados.....	22
2.2.1. Composición química de las raciones completamente mezcladas.....	22
2.2.2. Variación del peso vivo de las vacas, consumo de materia seca, producción y composición de leche.....	23
2.2.4. Comparación del consumo de materia seca con el NRC (2001) y el balance energético y proteico de las vacas alimentadas con raciones completamente mezcladas.....	25
2.2.5. Hormonas y metabolitos sanguíneos de las vacas.....	28
3. EVALUACIÓN DE RACIONES EN VACAS LECHERAS FISTULADAS.....	29
3.1. Materiales y métodos.....	29
3.1.1. Lugar y fecha.....	29

3.1.2. Tratamientos.....	29
3.1.3. Animales y diseño experimental.....	29
3.1.4. Alimentación.	29
3.1.5. Período experimental.....	30
3.1.6. Evaluación y registro de cinética de degradación, ambiente ruminal y tasa de pasaje de las RCM.	30
3.1.6.1. Cinética de degradación de la fibra en detergente neutro.....	30
3.1.6.2. Ambiente ruminal de las vacas lecheras fistuladas.....	31
3.1.6.3. Tasa de pasaje de sólidos.	32
3.1.7. Análisis estadístico	35
3.2. Resultados.	36
3.2.1. Parámetros de ambiente ruminal de las vacas lecheras fistuladas.	36
3.2.2. Cinética de digestión de la fibra en detergente neutro de raicilla de cebada y ensilaje de planta entera de maíz.	37
3.2.3. Tasa de pasaje de sólidos de las raciones completamente mezcladas en el tracto gastrointestinal.....	38
4. EVALUACIÓN DE RACIONES EN FERMENTADORES DE DOBLE FLUJO CONTINUO.	39
4.1. Materiales y métodos.	39
4.1.1. Lugar y fecha.	39
4.1.2. Tratamientos y diseño experimental.	39
4.1.3. Fermentadores.	40
4.1.4. Muestreo del líquido ruminal de los fermentadores de doble flujo continuo.	40
4.1.5. Registro y mediciones de pH en los fermentadores de doble flujo continuo.	41
4.1.6. Registro de los efluentes y recolección de las muestras, para estimar la digestibilidad aparente de las raciones completamente mezcladas en los fermentadores de doble flujo continuo.	41
4.1.7. Estimación de la digestibilidad aparente y tasas de digestión de las raciones completamente mezcladas en los fermentadores de doble flujo continuo.....	42
4.1.8. Estimación de las tasas de flujo de los fermentadores de doble flujo continuo.....	43
4.1.9. Análisis estadístico.	44
4.2. Resultados.	45
4.2.1. Composición química de las raciones completamente mezcladas y volúmenes sólidos de los fermentadores de doble flujo continuo.....	45
4.2.2. Ambiente ruminal in vitro de los fermentadores de doble flujo continuo.	46
4.2.3. Digestibilidad aparente de las raciones completamente mezcladas en fermentadores de doble flujo continuo.	48

4.2.4. Comparación entre fermentadores de doble flujo continuo y Daisy para estimar el balance energético y proteico según el NRC (2001).....	49
5. DISCUSIÓN.....	52
5.1. Primera parte: ensayos in vivo.	52
5.2. Segunda parte: ensayo in vitro.	66
5.3. Tercera parte: puntos en común de ensayos in vivo e in vitro.	69
6. CONCLUSIONES.....	72
7. APENDICE I.....	73
7.1. Estimación del balance energético y proteico de las vacas.	73
7.2. Fórmulas utilizadas para el cálculo de total de nutrientes digestibles de las raciones completamente mezcladas.	73
7.3. Fórmulas utilizadas para estimar el consumo de materia seca y los requerimientos energéticos de las vacas.....	74
Tabla I. Efecto de dos dietas RCM sub y RCM ens, sobre la digestibilidad aparente de la materia seca y el balance energético estimado según Nutrient Requirements of Dairy Cattle, NRC (2001) comparando los ensayos I y III.	78
7.4. Fórmulas empleadas para los requerimientos proteicos de las vacas.	79
Tabla II. Efecto de dos dietas RCM sub y RCM ens, sobre la digestibilidad de la proteína bruta y el balance proteico estimado según Nutrient Requirements of Dairy Cattle, NRC (2001) comparando los ensayos I y III.	82
8. BIBLIOGRAFÍA.....	83

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Raciones completamente mezcladas y la participación de cada alimento expresado en materia seca y las composiciones químicas de tabla empleadas para formular las raciones completamente mezcladas.....	17
Tabla 2. Características (promedio \pm desvío estándar) de las raciones completamente mezcladas ofrecidas a las vacas lecheras.	22
Tabla 3. Efecto de dos dietas RCM sub y RCM ens, sobre el consumo de materia seca y energía metabolizable, conversión, la variación de peso vivo diario, la producción y composición de leche en vacas lecheras.	23
Tabla 4. Efecto de dos dietas RCM sub y RCM ens, sobre la interacción tratamientos por semanas, del consumo de materia seca, la energía metabolizable y la producción de leche en vacas lecheras.	24
Tabla 5. Comparación del consumo de materia seca de las vacas para los tratamientos RCM sub y RCM ens y los estimados según el Nutrient Requirements of Dairy Cattle, NRC 2001.....	25
Tabla 6. Efecto de dos dietas RCM sub y RCM ens, sobre el balance energético de las vacas estimado según Nutrient Requirements of Dairy Cattle, NRC (2001).....	26
Tabla 7. Efecto de dos dietas RCM sub y RCM ens, sobre el balance proteico de las vacas estimado según Nutrient Requirements of Dairy Cattle, NRC (2001).....	27
Tabla 8. Efecto de dos dietas RCM sub y RCM ens, sobre las concentraciones plasmáticas de hormonas y metabolitos de las vacas lecheras.	28
Tabla 9. Efecto de dos dietas RCM sub y RCM ens, sobre el pH, nitrógeno amoniacal y concentraciones de ácidos grasos volátiles en líquido ruminal de vacas fistuladas. ...	36
Tabla 10. Efecto de dos dietas RCM sub y RCM ens, sobre la cinética de digestión de la fibra en detergente neutro de ensilaje de planta entera de maíz y raicilla de cebada en vacas fistuladas.	37
Tabla 11. Efectos de dos dietas RCM sub y RCM ens, sobre el tiempo de retención en los distintos compartimientos del tracto digestivo de vacas fistuladas.....	38

Tabla 12. Composición mineral de la saliva artificial utilizada en los fermentadores de doble flujo continuo que recibieron dos dietas, RCM sub y RCM ens.	40
Tabla 13. Características (promedio \pm desvío estándar) de dos raciones completamente mezcladas evaluadas en fermentadores de doble flujo continuo, base materia seca.	45
Tabla 14. Composición química de los efluentes de rebalse (promedio \pm desvío estándar) de los fermentadores de doble flujo continuo que recibieron dos dietas RCM sub y RCM ens, en base materia seca.	46
Tabla 15. Efecto de dos dietas RCM sub y RCM ens, sobre el pH, las concentraciones de nitrógeno amoniacal y ácidos grasos volátiles del líquido de los fermentadores de doble flujo continuo.	47
Tabla 16. Efectos de dos dietas RCM sub y RCM ens, sobre la digestibilidad de las distintas fracciones químicas de las RCM y las tasas de dilución de líquidos y sólidos, en fermentadores de doble flujo continuo.	48
Tabla 17. Efectos de dos dietas RCM sub y RCM ens, sobre la digestibilidad aparente de la materia seca, energía bruta, digestible, metabolizable y neta de lactancia obtenidas por Daisy o Fermentadores.	49
Tabla 18. Efecto de dos dietas RCM sub y RCM ens, sobre el balance energético y proteico de las vacas según Nutrient Requirements of Dairy Cattle, NRC (2001) comparando las digestibilidades aparentes de Daisy y Fermentadores.	50

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Degradación efectiva de la FDN de raicilla de cebada y ensilaje de planta entera de maíz a diferentes tasas de pasajes del rumen.	38
Figura 2. Relación entre la producción de leche grasa corregida al 4% y el consumo de materia seca observado para RCM sub, RCM ens y el predicho por el NRC.....	54
Figura 3. Comparación de los consumos observados en función de los consumos calculados en base al NRC en vacas lecheras que recibieron RCM sub y RCM ens. La línea continua representa $y=x$, los puntos redondos, el consumo observado para cada tratamiento.....	55
Figura 4. Consumo de energía neta de lactancia de las vacas en comparación con la energía neta de lactancia requerida para los tratamientos RCM sub y RCM ens. La línea continua $y=x$, los puntos redondos el consumo de ENL Mcal día ⁻¹	56
Figura 5. Relación entre los requerimientos energéticos y el balance energético 0 % de ENI para RCM sub y RCM ens. Los consumos observados y la ENI por Mcal KgMS corregida asumiendo que la DIVMS fue de 53,94 % RCM sub y 54,42 % RCM ens...	57

LISTADO DE ABREVIATURAS

A	Efecto animal
AGNE	Ácidos grasos no esterificado
AGV	Ácidos grasos volátiles
ALM	Almidón en base de materia seca
BC	Bacterias celulolíticas
b-GH	Somatotrofina
BUN	Nitrógeno ureico en sangre
CMS	Consumo de materia seca
CMSm	Consumo de MS para mantenimiento
CNF	Carbohidratos no fibrosos
CSA	Carbohidratos solubles en agua en base de materia seca
D	Descuento
DaMS	Digestibilidad aparente de la materia seca
DFDN	Digestibilidad de la fibra en detergente neutro
DG	Digestibilidad de la grasa
DiscED	Descuento energía digestible
DIVMS	Digestibilidad <i>in vitro</i> de la materia seca
DMS	Digestibilidad de la materia seca
Dp	Días de preñez
DV	Descuento variable
EB	Energía Bruta
ED	Energía digestible
EE	Extracto etéreo
EffPM_NPg	Coeficiente de eficiencia de utilización de la proteína neta

EM	Energía metabolizable
Emng	Energía metabolizable corregida
EndCP	Proteína cruda endógena
EN _g	Energía neta de cambio de peso
Enges	Energía neta de gestación
ENI	Energía neta de lactancia
EN _{leche}	Energía neta de la leche
ENp	Energía neta de producción de leche
FDA	Fibra en detergente ácido
FDFC	Fermentador de doble flujo continuo
FDN	Fibra en detergente neutro
H	Efecto hora
HDC	Hidratos de carbono
IGF-1	Somatomedinas
Kd	Tasa de digestión
KgMS ha ⁻¹	Kilogramos de materia seca por hectárea
kp	Tasa de pasaje
LGC	Leche grasa corregida
Mcal EM día ⁻¹	Megacalorías de energía metabolizable por día
Mcal EM KgMS ⁻¹	Megacalorías de energía metabolizable por kilogramo de materia seca
min día ⁻¹	Minutos por día
MO	Materia orgánica
MS	Materia seca
N-NH ₃	Nitrógeno amoniacal
NU	Nitrógeno ureico
PB	Proteína bruta

PCMtotal	Rendimiento total microbiano
PCV	Peso del cuerpo vacío
PDL	Producción diaria de leche
PDR	Proteína degradable en rumen
Per	Efecto período
pH	Potencial hidrógeno
pKa	Constante de disociación ácida
PMalimento	Proteína metabolizable del alimento
PM _{bacteriana}	Proteína metabolizable bacteriana
PMc	Proteína metabolizable crecimiento
PMendo	Proteína metabólica endógena
PMendoreq	Requerimientos de proteína endógena de proteína metabólica
PMg	Proteína metabolizable de gestación
PM _L	Proteína metabolizable de lactancia
PMm	Proteína metabolizable de mantenimiento
PM _{PP}	Proteína metabolizable de pérdida de peso
PNc	Proteína neta crecimiento
PNDR	Proteína no degradable en rumen
PV	Peso vivo
PVN	Peso al nacimiento del ternero
RCM	Ración completamente mezclada
RCM ens	Ración completamente mezclada ensilajes
RCM sub	Ración completamente mezclada subproductos
S	Efecto semana
SDN	Solubles en detergente neutro
T	Efecto tratamientos

TDL	Tasa de dilución de líquidos
TDS	Tasa de dilución de sólidos
TND	Total de nutrientes digestibles
TNDact	Total de nutrientes digestibles actuales
TNDadj	Total de nutrientes digestibles ajustados
TNDconc	Total de nutrientes digestibles concentrado
TNDdieta	Total de nutrientes digestibles de la dieta
totalTND	Porcentaje de total nutrientes digestibles de las raciones completamente mezcladas
TRC	Tiempo de recambio del ciego y colon proximal
TRR	Tiempo de retención retículo y rumen
TT	Tiempo de recambio del omaso, intestino delgado y la parte distal del intestino grueso.
TTPR	Tiempo total promedio de retención
TxH	Efecto tratamiento por hora
TxS	Efecto tratamiento por semana
TxP	Efecto tratamiento por período
Yprot	Producción de proteína láctea
\$ KgMS ⁻¹	Pesos por kilogramo de materia seca

RESUMEN

La utilización de subproductos agroindustriales (SA) en la alimentación de vacas lecheras está cobrando cada día más importancia, debido a una creciente industrialización en origen que genera una gran diversidad de alimentos. El objetivo fue comparar dos raciones completamente mezcladas (RCM) isoenergéticas, isoproteicas e isofibrosas, una basada en SA (T1) y otra basada en ensilaje de planta entera de maíz (T2). Para cumplir con este objetivo se realizaron tres ensayos, el ensayo I con vacas lecheras, el ensayo II con vacas lecheras fistuladas en el rumen y el ensayo III con fermentadores de doble flujo continuo. En el primero se utilizaron 26 vacas múltiparas, en un diseño completamente aleatorizado (DCA). La composición química de T1 y T2 fue: 55,5 y 65,3 % MS; 66,1 y 67,3 % de digestibilidad de la materia seca; 17,1 y 16,5 % proteína bruta; 39,2 y 40,0 % de fibra en detergente neutro (FDN); 2,40 y 2,43 Mcal/kg MS de energía metabolizable, respectivamente. El consumo de materia seca y el de energía metabolizable, la producción y composición de leche, la variación de peso de las vacas, las concentraciones de somatotrofina, somatomedina, insulina, ácidos grasos no esterificados, glucosa no presentaron diferencias significativas ($P>0,05$), el nitrógeno ureico sanguíneo fue mayor para SA ($P<0,05$). En el ensayo II, se utilizaron 4 vacas fistuladas en un diseño cross over que recibieron los tratamientos T1 y T2. Se avaluó el ambiente ruminal, cinética de digestión de la FDN y la tasa de pasaje. El ambiente ruminal (pH, N-NH₃ y AGV) no presentaron diferencias significativas ($P>0,05$). Para evaluar, la cinética de digestión ruminal se incubaron en el rumen FDN de raicilla de cebada y ensilaje de planta entera de maíz. Los parámetros que presentaron diferencias significativas ($P<0,05$) fueron la fracción soluble, la degradación potencial y el tiempo de retardo, siendo los porcentajes mayores para FDN de ensilaje de planta entera de maíz. La fracción degradable no presentó diferencias significativas ($P>0,05$). La tasa de degradación por hora y la degradación efectiva de la FDN en las horas 36 y 48 presentó tendencia ($P=0,10$) a ser mayor para raicilla de cebada. Para la tasa de pasaje de las RCM, se utilizaron 6 vacas fistuladas en un DCA, para ambos tratamientos se empleó un pulso en el rumen de fibra de ensilaje de planta entera de maíz marcada con cromo. Los parámetros se estimaron con el programa de computación cinética de la digestión en rumiantes. El tiempo de retención del rumen, el tiempo de recambio del ciego y colon, el tiempo total promedio de retención no presentaron diferencias significativas ($P>0,05$). El ensayo III se utilizaron 4 fermentadores de doble flujo continuo, que recibieron los tratamientos T1 y T2, en un diseño cross over. Se evaluó el ambiente ruminal *in vitro* y la digestibilidad aparente de los componentes químicos de las RCM. El ambiente ruminal *in vitro* y la digestibilidad aparente de los componentes químicos de las RCM no presentaron diferencias significativas ($P>0,05$). El uso de subproductos agroindustriales en RCM permite mantener el nivel productivo de una RCM que incluya ensilaje de planta entera de maíz.

Palabras claves: vaca lechera, subproductos agroindustriales, ambiente ruminal *in vivo* e *in vitro*.

ABSTRACT

Agro-industrial by-products (AB) utilization in the diet of dairy cows is each day gaining more importance, due to a growing industrialization in origin that generates a great diversity of food. The objective was to compare two total mixed ration (TMR) isoenergetic, isoproteic and isofibrous, one based on AB (T1) and another based on whole plant maize silage (T2). To comply with this objective three trials were carried out: trial I with dairy cows, trial II with dairy cows fistulated in the rumen and trial III with dual continuous flow fermenters. In the first one 26 multiparous cows were used, in a completely randomized design (CRD). The chemical composition of T1 and T2 was: 55.5 and 65.3% DM; 66.1 and 67.3% of dry matter digestibility; 17.1 and 16.5% raw protein; 39.2 and 40.0% of neutral detergent fibre (NDF); 2.40 and 2.43 Mcal/kg DM of metabolizable energy, respectively. Dry matter and metabolizable energy consumption, milk production and composition, cow weight variation, and somatotrophine, somatomedin, insulin, non esterified fatty acids, and glucose concentrations did not show any significant variations ($P>0.05$). Blood urea nitrogen was greater for AB ($P<0.05$). In the trial II, 4 cows fistulated in a crossover design received T1 and T2 treatments. Ruminal environment, NDF digestion kinetics and passage rate were evaluated. Ruminal environment (pH, N-NH₃ and VFA) did not show any significant variations ($P>0.05$). To evaluate ruminal digestion kinetics, NDF barley rootlets and whole plant maize silage were incubated in the rumen. The parameters that showed significant variations ($P<0.05$) were soluble fraction, potential degradation and lag time, the percentages being greater for NDF whole plant maize silage. Degradable fraction did not show any significant variations ($P>0.05$). Hourly Degradation rate and NDF effective degradation in the hour 36 and 48 showed a tendency ($P=0.10$) to be greater for barley rootlets. As regards TMR passage rate, 6 cows were fistulated in a CRD, for both treatments a pulse in the rumen of whole plant maize silage fiber marked with chromium was used. The parameters were reckoned with the kinetic digestion in ruminants computer program. Rumen retention time, caecum and colon refilling time, and the average total retention time did not show any significant differences ($P>0.05$). In trial III, 4 dual continuous flow fermenters were used, which received T1 and T2 treatment in a cross over design. Ruminal in vitro environment and apparent digestibility of RCM chemical components were evaluated. They did not show any significant variations ($P>0.05$). The use of agro-industrial by-products in TMR allows keeping a TMR productive level that includes whole plant maize silage.

Keywords: Dairy cow, agro-industrial by-products, ruminal in vivo or in vitro environment.

1. INTRODUCCIÓN

En Argentina, en las últimas dos décadas el cambio socio-económico agropecuario, modificó la estrategia productiva y de alimentación en los sistemas pastoriles de producción de leche. Por esta razón, algunos sistemas lecheros para aumentar la carga animal y la productividad de leche por hectárea, utilizan raciones completamente mezcladas (RCM) en encierres temporarios o permanentes.

El alto precio de los cereales y oleaginosas estimula el avance de la agricultura sobre la región pampeana. Para el MAGYP (2011 a) desde el año 1990 a 2010 la superficie dedicada a la agricultura se incrementó en el país un 63%.

Según el SENASA (2011), el 90% de los establecimientos lecheros se encuentran en la región pampeana, que posee el 92,4% de las existencias bovinas lecheras del país. La estratificación de los establecimientos es de la siguiente forma: 3,1% posee menos de 100 cabezas, el 54,4% entre 101 a 500 cabezas y el 42,5 % más de 501 bovinos.

La clara competencia por el uso de la tierra de los sistemas productivos agrícola versus lechero, debido principalmente a su ubicación geográfica pampeana, restringe la superficie dedicada a la implantación de praderas y verdeos en los sistemas de producción lecheros pastoriles pampeanos.

En este contexto, ha cobrado cada vez más importancia la siembra de verdeos de verano para su utilización como forraje conservado bajo la forma de ensilaje, por sus ventajas de alta producción por hectárea de KgMS ha^{-1} y el bajo costo por $\text{\$ KgMS}^{-1}$. El ensilaje de planta entera de maíz, se ha convertido en el alimento de base forrajera en épocas del año donde los otros recursos forrajeros escasean, ya sea por la competencia del recurso tierra con agricultura o por factores climáticos.

El ensilaje de planta entera de maíz, es uno de los principales componentes de las RCM empleadas por los productores lecheros. La dependencia de este insumo es tan evidente, que sólo cuando el precio de la leche es muy elevado o cuando se ha agotado la reserva producida en el establecimiento, los productores recurren a la compra de subproductos para sustituirlo. Esta situación, ocurre cada vez con mayor frecuencia en los sistemas de producción de leche.

Se considera, que un tercio de los granos producidos en el mundo se destinan a la alimentación animal. Las proyecciones de crecimiento demográfico mundial, estiman que anualmente 80 millones de personas se incorporan a la demanda de alimentos. Los productos agroindustriales adquieren importancia, debido a que la tendencia

mundial de la agro-industrialización en origen es cada vez mayor, generando subproductos que pueden ser utilizados en la alimentación animal en integraciones verticales de industrias agroalimentarias y productores agropecuarios, disminuyendo los costos de tratamiento ambiental de los subproductos agroindustriales y mejorando el desempeño de las economías regionales.

Según el MAGYP (2012), la molienda o procesado de cereales y oleaginosas en el país, para consumo humano y animal, se incrementó un 168 % en los últimos 10 años. Proyecciones del PEA (2010), consideran desde 2010 al 2020 un incremento de las exportaciones totales del sector agroalimentario y agroindustrial de USD 39.358 millones a USD 99.710 millones, lo cual representa un 153% de crecimiento.

La magnitud de la industrialización de los productos agrícolas con distintos fines, en la alimentación humana y animal, generan excedentes de subproductos agroindustriales con cualidades nutricionales interesantes.

Algunos subproductos agroindustriales húmedos y/o secos en Argentina, presentan fundamentalmente un uso regional, debido a los altos costos que implica su traslado. Sin embargo, hay empresas que se dedican a su comercialización y pueden trasladar estos subproductos, como la malta húmeda y la pulpa de citrus, aprovechando fletes de retornos.

Los subproductos húmedos constituyen un desafío en el armado de las raciones, debido a su alto contenido de agua que puede limitar el consumo de materia seca (NRC, 2001). Otros, en cambio poseen un alto contenido de materia seca como la raicilla de cebada con un porcentaje alto de FDN y proteína, situación que puede estar morigerada por una alta tasa de tránsito de los subproductos, que por sus características intrínsecas de partículas pequeñas, permanecen poco tiempo en el rumen y permiten un mayor consumo.

Al describir la procedencia y características nutricionales del ensilaje de planta entera de maíz y los subproductos, se observan rasgos diferenciales.

Los ensilajes de maíz en Argentina, provienen del corte y picado de planta entera de maíz con distintos estados fenológicos, dependiendo de la época del año o condiciones climáticas. En la campañas 2007/2008, se ensilaron unas 700.000 ha de maíz para la alimentación animal (Bragachini; Peiretti, 2008).

El ensilaje de planta entera de maíz, es un alimento de baja energía metabolizable y proteína bruta, con la mitad de la materia seca constituida por pared celular. La composición química del ensilaje en proteína bruta (PB) es de 7,33 % \pm 1,71, FDN

47,42 % \pm 6,71, fibra en detergente ácido (FDA) 28,22 % \pm 4,21, materia seca (MS) 31,76 % \pm 6,41 (Guaita; Fernández, 2005).

El mayor constituyente del ensilaje de planta entera de maíz es la FDN, que presenta diversas características de cinética de digestión y pasaje. La tasa de degradación varía entre 3,19 % h⁻¹ a 3,95 % h⁻¹ (Johnson *et al.*, 2003; Taylor; Allen, 2005), la tasa de pasaje (kp) de la FDN potencialmente digestible es de 2,37 % h⁻¹ a 2,68 % h⁻¹ y de la FDN indigestible de 3,01 % h⁻¹ a 3,52 % h⁻¹ (Oba; Allen, 2003; Taylor; Allen, 2005). Además, posee una fracción soluble entre 3,90 % a 15,21 % (Ouellet *et al.*, 2003; Boucher *et al.*, 2007; Rossi *et al.*, 2010) y un "lag time" de 0,4 h a 12 h (Boucher *et al.*, 2007; Fernandez *et al.*, 2003).

La raicilla de cebada, es un subproducto procedente de la fabricación de la cerveza, proviene de germinar los granos de cebada para transformarlos en malta, el rendimiento promedio por cada 100 kg de cebada es de 5 kg de raicilla de cebada (Blas *et al.*, 2010). En Argentina, en el año 2009 la industria utilizó 852 mil toneladas de cebada, obteniendo como subproducto 42 mil toneladas de raicilla de cebada (MAGYP, 2012).

La raicilla de cebada tiene un elevado contenido en fibra y esta es poco lignificada, parte de la fibra se encuentra en forma de galactosanas y pentosanas, además contiene una proporción significativa de almidón y de azúcares, principalmente sacarosa (Blas *et al.*, 2010).

La composición química de la raicilla de cebada, es de PB 25,81 % \pm 3,52, FDN 38,88 % \pm 3,51, FDA 16,96 % \pm 0,81 y MS 96,77 % \pm 2,41 (Guaita; Fernández, 2005). La tasa de degradación de la FDN de la raicilla de cebada es de 3,61 % h⁻¹, la fracción soluble de 14,22 % y tasa de pasaje del 7 % h⁻¹ (Swain; Armentano, 1994).

La malta húmeda es el bagazo remanente de la elaboración de cerveza (Garciaarena; Hofer, 1996), se compone principalmente por malta (cebada malteada) y sémola de maíz o arroz quebrado, sometidos a distintas temperaturas durante el proceso industrial.

Se caracteriza por poseer la siguiente composición química de PB 26,45% \pm 5,46, FDN 60,61% \pm 13,46, FDA 24,3% \pm 6,33, MS 23,93 % \pm 4,14 (Gaggiotti *et al.*, 2008).

La tasa de degradación de la FDN para la malta húmeda varía entre 3,71 % h⁻¹ a 6,51 % h⁻¹, con una fracción soluble de 14,22 % (Swain; Armentano, 1994) y presenta un "lag time" de 0,5 a 2 h (Swain; Armentano, 1994; Torren *et al.*, 1994; Depeters *et al.*, 1997; Younker *et al.*, 1998; Trujillo *et al.*, 2010) con una tasa de pasaje 7,26 % h⁻¹ (Younker *et al.*, 1998).

La pulpa de cítricos, es un subproducto de la extracción de jugo, por cada kg de cítricos se obtiene 0,49 a 0,69 kg de pulpa, compuesta por piel 60 – 65 %, segmentos del fruto 30 - 35 % y semillas 0 – 10 %, además de poseer un elevado contenido de carbohidratos solubles (20%) y en pectinas (30%) (Calsamiglia *et al.*, 2004).

En Argentina, en el año 2009 se industrializaron 1,31 millones de toneladas, con una producción estimada de subproducto de pulpa de cítricos 641 - 903 mil toneladas (MAGYP, 2011 b).

La composición de química de la pulpa de cítricos es de PB 7,47 % \pm 2,96, FDN 23,81 % \pm 3,81, FDA 12,02 % \pm 10,49 y MS 26,53 % \pm 5,54 (Gaggiotti *et al.*, 2008).

La tasa de degradación de la FDN de la pulpa de cítricos varía entre 3,5 % h⁻¹ a 9,4 % h⁻¹ (Depeters *et al.*, 1997, Barrios-Urdaneta *et al.*, 2003, Trujillo *et al.*, 2010) y presenta un “lag time” de 5,4 h (Barrios-Urdaneta *et al.*, 2003), con una tasa de pasaje de 6,5 % h⁻¹ (Tagari *et al.*, 1995).

En la actualidad, se presenta una demanda creciente de información sobre producción de leche en sistemas en confinamiento, con alta inclusión en las dietas de subproductos agroindustriales en RCM, para reemplazar el ensilaje de planta entera de maíz cuando la coyuntura lo requiera.

Según el NRC (2001), la FDN debería representar como mínimo el 25 % de una RCM y el máximo es una función de la exigencia de energía neta de lactancia (ENL) de la vaca en lactación. Los CNF no deben superar el 44 % de una RCM, para evitar problemas de conductas alimenticias y sobre el ambiente ruminal.

Se ha reportado, una disminución lineal en el consumo de materia seca en RCM cuando el porcentaje de materia seca disminuyó (Larh *et al.* 1983). La reducción del consumo de materia seca se atribuye a un aumento del llenado ruminal de las RCM más húmedas (Robison *et al.*, 1990; Miller-Cushon; DeVries, 2009).

Además, se estableció que las RCM mas húmedas son menos estables, es decir se descomponen con mayor facilidad, en especial en periodos de mayor temperatura ambiental.

Las mayoría de las RCM que se utilizan en alimentación de vacas lecheras se ubican entre 40 a 60 % de MS (Eastridge, 2006). En un estudio realizado por Mertens (1995), los animales se alimentaron con raciones conteniendo distintas concentraciones de FDN (25 a 55%), la máxima respuesta de leche grasa corregida al 4%, se obtuvo con el 1,2 % \pm 0,1 del peso vivo de FDN en las raciones. Concluye que este es el valor del máximo de consumo de FDN en las RCM.

Los valores de TND o la energía digestible (ED) de los alimentos, son calculados a partir de la digestibilidad obtenida con animales alimentados a nivel de consumo de mantenimiento, estos valores TND o ED sobreestiman los obtenidos en animales de alta producción, donde la digestibilidad es deprimida por el alto consumo de materia seca (Merchen, 1993).

Para Mertens (1987) la relación entre la tasa de pasaje y la tasa de digestión, definen la digestibilidad de los alimentos. Los alimentos que más se afectan con la tasa de pasaje son los que poseen una tasa de digestión (K_d) de $3\% h^{-1}$. Por ejemplo: un alimento con una K_d de $3\% h^{-1}$ y una K_p de $2,08\% h^{-1}$ (48 h) posee una digestibilidad de materia seca (DMS) del 59 %, si la tasa de pasaje aumenta a K_p $4,16\% h^{-1}$ (24 h) se obtiene una DMS del 42 %. La pérdida en energía metabolizable del alimento al aumentar el K_p es del $0,62\text{ Mcal kg ms}^{-1}$.

El consumo de alimento, es asimismo regulado y limitado por los requerimientos fisiológicos y metabólicos de los animales, por ello a una mayor demanda de energía se requiere de un mayor consumo, llenado del rumen y un aumento de la tasa de pasaje, convirtiéndose en una limitante en dietas con mayor densidad energética (Van Soest, 1994 b).

La regulación del consumo es un proceso extremadamente complejo que involucra muchas interacciones entre el animal, el alimento y la forma de la alimentación (Mertens, 1994).

Para Mertens (1994), los animales comen para satisfacer su demanda de energía, si se cambia la densidad energética de la ración, el animal responde ajustando su consumo. Así, si un alimento es de alta concentración energética y de bajo contenido de fibra, el animal consume hasta cubrir su demanda de energía, pero puede tener un consumo mayor que su requerimiento y almacenar el exceso de energía en forma de grasa. Lo contrario sucede con un alimento de baja concentración energética, alto en fibra, donde el animal aumenta el consumo para cubrir sus requerimientos y el límite al consumo está dado por el llenado ruminal.

El concepto de llenado ruminal, está más relacionado con la FDN. La fibra del alimento, que ocupa lugar en el rumen, debe ser procesada por la masticación y la digestión en el rumen. Estos dos mecanismos definen la capacidad de procesamiento y llenado de las vacas.

Las RCM poseen variadas tasas de pasajes ruminales y contenido de FDN. Según estudios las reportan en los siguientes valores, la K_p $3,07\% h^{-1}$, FDN 33,33 % (Teimouri Yansari *et al.*, 2004), K_p $3,13\% h^{-1}$, FDN 32,61 % (Beauchemin; Yang,

2005), Kp 4,06 % h⁻¹, FDN 32,01 % (Adin *et al.*, 2009), Kp 4,06 % h⁻¹, FDN 36,15 % (Yang; Beauchemin, 2006).

En un estudio realizado por Zebeli *et al.* (2008), se evaluaron 58 ensayos con un total de 238 tratamientos de RCM. El consumo de materia seca (CMS) promedio fue de 22,31 ± 3,28 kg día⁻¹ y una producción de leche de 34,90 ± 5,78 litros día⁻¹. El porcentaje de forraje en las RCM varió entre 26,81 y 80,84 % de la MS (49,42 ± 10,60 %). La FDN fue de 18,22 a 49,01 % de la MS (32,52 ± 7,09 %) y FDN del forraje entre 11,55 y 44,99 % de la MS (21,91 ± 5,98 %). En estos ensayos, las Kp se midieron utilizando marcadores externos (por ejemplo: iterbio, cromo), las Kp oscilaron entre de 1,91 a 8,42 % h⁻¹, con un promedio de 4,09 % h⁻¹. En general, el promedio diario de pH ruminal varió desde 5,30 hasta 6,73 (6,10 ± 0,26) y la digestibilidad de la FDN fue desde 28,41 hasta 64,66 %.

La digestibilidad de la FDN en el total del tracto gastrointestinal depende del pH ruminal y la tasa de pasaje del contenido del retículo rumen. Ambas variables explican el 62 % de la variación de la digestibilidad de la FDN (Zebeli *et al.* 2008).

Debido a que el pH ruminal tiene profundos efectos sobre las poblaciones microbianas, se considera como un factor crítico en el funcionamiento normal y estable del rumen.

Según Yang *et al.* (2002) la disminución del promedio de pH ruminal diario de 6,18 a 5,78, se asocia a un aumento de tasa de pasaje del retículo rumen de 2,5 a 3,4 % h⁻¹, además de una disminución de la degradabilidad de la FDN en el rumen de 40 a 37 % y de la digestibilidad total del tracto gastrointestinal de 52 a 42 %.

Similar a lo reportado por Zebeli *et al.* (2007), donde se observó el incremento de la tasa de pasaje del rumen de 2,7 a 4 % h⁻¹ y una disminución de la digestibilidad total del tracto gastrointestinal de la FDN de 55 a 50%.

En otro estudio *in vitro*, realizado por Grant; Mertens (1992 a) se compararon distintas fuentes de forrajes y distintos niveles de pH (5,8 y 6,8) para evaluar la digestibilidad de la FDN, y concluyeron que el pH 5,8 afecta la digestibilidad de la FDN *in vitro*, debido principalmente al incremento del "lag time" de 6,9 h (pH 6,8) a 11,9 h (pH 5,8). En relación de la tasa de digestión, se vio afectada solamente en el ensilaje de maíz, aun pH de 6,8 y la Kd fue 6,7 % h⁻¹ y cuando se disminuyó el pH a 5,8 la Kd fue de 4,1 % h⁻¹. Además, se evaluaron otros alimentos, pero la Kd fue constante en los distintos niveles de pH (5,8 y 6,8).

En vacas que son alimentadas una sola vez al día, el pH desciende después de la alimentación por un periodo de pocas horas y se incrementa otra vez por la remoción

de ácidos grasos volátiles (AGV), salivación y rumia. El pH en vacas de alta producción varía según la frecuencia de alimentación, en dietas con concentrados > a 45 % de la ración en % MS, el pH oscila entre 6,6 antes de la alimentación, a 5,3 a 5,5 en los procesos de fermentación intensivos posterior a la alimentación. La cantidad de tiempo por día que el pH se encuentra a un nivel sub óptimo o el tiempo que el pH se encuentra a un nivel óptimo, parecen ser un mejor determinante de la degradación de la fibra que el promedio diario de pH (Zebeli *et al.*, 2008).

La investigación realizada por Zebeli *et al.* (2008) demostró, con un 99% de probabilidad, que un promedio ruminal de pH 6,16 permite tener un pH inferior a 5,8 durante 5,24 h día⁻¹. Los promedios superiores a pH 6,16 acortan el tiempo por debajo de pH 5,8. Lo contrario pasa con promedios inferiores a pH 6,16, donde el tiempo aumenta por debajo de pH 5,8.

Los efectos del pH menor a 6, en estudios *in vitro* e *in vivo*, han demostrado que la digestibilidad de la FDN disminuye (Grant, Mertens; 1992 a; Yang *et al.*, 2002; Zebeli *et al.*, 2007).

La celulosa es el polímero más abundante en la naturaleza y los rumiantes para poder degradarla, han establecido simbiosis con numerosos microorganismos, dentro de estos, se encuentra las bacterias celulíticas (BC). Las bacterias *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens* y *Ruminococcus albus*, generalmente, son considerados como los microorganismos celulolíticos más predominantes en el rumen (Weimer, 1996).

El proceso de digestión activa de celulosa implica la adhesión de los microorganismos a través de una estructura extra celular de glicoproteínas denominada glicocálix, que protege a las BC de protozoos y de sus enzimas proteolíticas, en la superficie de los alimentos para comenzar la digestión por las enzimas celulasas (Weimer, 1996).

Las barreras que impiden la adhesión de las BC, son las características físicas de la celulosa y las ambientales del rumen (Weimer, 1996; Russell; Wilson, 1996, Mouriño *et al.*, 2001).

Por otra parte la estructura de la pared celular de los alimentos, limita el acceso al contenido celular del alimento a las BC. Dentro de los efectos ambientales el más importante es el pH, las BC no pueden resistir las condiciones temporales de pH bajo, que conllevan las prácticas de alimentación con RCM, para desarrollar un crecimiento poblacional exponencial.

Esto es debido, que el pH bajo limita el crecimiento de las bacterias sobre la celulosa y celobiosa. Además de provocar una disminución de celulasas per se, las bacterias celulolíticas no pueden crecer con un pH bajo intracelular, ya que un aumento en el gradiente de pH conduce a toxicidad con aniones (Russell; Wilson, 1996).

En resumen, la menor fermentación de la celulosa a pH bajo puede ser debido a la inhibición de la adherencia, hidrólisis de celulosa, del crecimiento de las BC o de una combinación de estos factores.

Las concentraciones de los AGV en el fluido ruminal tienen una estrecha relación con el pH, dado que por cada mol de AGV producido se produce un mol de H^+ (Aschenbach *et al.* 2011).

El sistema de amortiguamiento de los AGV es uno de los más importantes del rumen, la absorción y la tasa de pasaje de los AGV definen la dinámica diaria del pH ruminal. Este sistema depende del $pK_a = 4,8$ de los AGV, utilizando la ecuación de Henderson-Hasselbalch el 1, 10, 50, 90, y 99 % de AGV liberan los protones a un pH de 2,8; 3,8; 4,8; 5,8 y 6,8. El equilibrio del pH que se llegaría si sólo estuviesen presentes los AGV en el rumen sería un pH de 4,8. Es evidente que el 80 % del poder buffer de los AGV se encuentra a un pK_a de los AGV ± 1 .

Al utilizar mayor cantidad de concentrados en las dietas, por fermentación se forma más ácido láctico, el cual posee un $pK_a = 3,86$ y estabiliza el pH del rumen a 1 unidad menos que el sistema AGV.

Otro sistema de amortiguamiento del pH ruminal es la saliva, que posee dos componentes de importancia buffer. El fosfato salivar que su concentración es de 20 a 30 $mmol\ l^{-1}$ de saliva con un pK_a de 7,21 y el bicarbonato salivar tiene una concentración de 120 $mmol\ l^{-1}$ de saliva, el pK_a depende de dos sistemas. El primero cerrado en ausencia de agua con pK_a de 3,8 y el segundo abierto, en una solución acuosa con pK_a 6,1.

En vacas lecheras, con máximas secreciones salivares de 250 $l\ día^{-1}$ y un pH ruminal 6,2 o menor, el fosfato amortigua 5 moles $día^{-1}$ de protones y el bicarbonato amortigua 27 moles $día^{-1}$ de protones (Aschenbach *et al.*, 2011). Los dos sistemas, fosfato y bicarbonato, a una máxima producción salivar (250 $l\ día^{-1}$) neutralizarían 32 moles $día^{-1}$ de H^+ . La eliminación de H^+ del rumen a través de la dilución, absorción y almacenamiento describe mejor la variación del pH ruminal (Allen, 1997).

La magnitud de las tasas de salivación influyen los valores de pH. El máximo límite fisiológico para rumiar en vacas lecheras propuesto por Welch (1982) es de 10

horas día⁻¹. El volumen de secreción de saliva en rumia es 1,8 veces mayor que en reposo. En alimentación es de 0,18 a 0,22 l min⁻¹ y en reposo de 0,10 a 0,15 l min⁻¹ (Cassida; Stokes, 1986; Maekawa *et al.*, 2002).

Las características del alimento condicionan la salivación del bolo alimenticio por las vacas. Cuando el tamaño de partícula es pequeño como en el caso de los concentrados y ensilajes, la cantidad de saliva es menor con respecto a partículas de mayor tamaño, como en los henos. La proporción de saliva en los bolos alimenticios, es de 50 % de humedad para concentrados y 80 % de humedad para forrajes. El menor tamaño de partícula permite formar un bolo alimenticio mucho más rápido y esté sería el motivo por el que el tamaño de partícula condiciona la ingesta de saliva por unidad de materia seca consumida (Maekawa *et al.*, 2002).

Se ha encontrado una correlación positiva entre la relación del tiempo por debajo de pH 5,8 y la secreción de saliva, a mayor tiempo por debajo de pH 5,8 la secreción de saliva es mayor, pero esta mayor secreción de saliva tiene un escaso efecto sobre el aumento del pH (Penner; Beauchemin, 2010).

Se estima que la tasa de pasaje de líquido del rumen es igual a la tasa de secreción de saliva (Allen, 1997; Maekawa *et al.*, 2002). La tasa de absorción de los AGV depende de las contracciones ruminales (en pH ácido las contracciones disminuyen), de la superficie de las papilas, del llenado ruminal y de la integridad epitelial (Allen *et al.*, 2006).

Penner *et al.* (2009) describen que la absorción AGV se produce a 1,97 a 2,07 mol h⁻¹ y un pasaje AGV del rumen de 0,8 a 1 mol h⁻¹. En vacas lecheras se estima que el 50 a 85 % de los AGV producidos se absorben en rumen y la tasa de pasaje de los AGV es entre 29 y 39 % del total producido (Aschenbach *et al.*, 2011). La absorción en el rumen de AGV es el principal control al pH ruminal y el 15% de la eliminación de protones del rumen corresponde al pasaje de pasaje de AGV asociados, el NH₄⁺, el H₂PO₄⁻ al tracto gastrointestinal posterior (Allen, 1997).

Los AGV que pasan al tracto digestivo posterior son utilizados por la flora intestinal o absorbidos y metabolizados por el ciego y colon, siendo la principal contribución energética para las células epiteliales intestinales del intestino grueso (Bergman, 1990).

La absorción de AGV por el rumen contribuye al equilibrio del pH ruminal. Se absorben asociados y disociados de un protón. Los primeros son lipofílicos, presentes en mayor proporción en condiciones ácidas y los segundos disociados en condiciones

más neutras de pH, estos se absorben por un sistema antiportador AGV y HCO_3^- . Este último, es el sistema que más contribuye en la estabilización del pH.

Los AGV dentro de la célula epitelial ruminal, pierden el protón o lo ganan, estos pasan al torrente sanguíneo por tres mecanismos por un canal de aniones grandes de absorción pasiva (AGV disociados), por sistema antiportador (AGV disociado y HCO_3^-) y los lipofílicos (AGV asociados). Otro mecanismo importante de la regulación del pH es el que involucra al ácido láctico, este se conoce como sistema simportador, donde entra y salen de la célula epitelial ruminal un lactato disociado y un protón.

El sistema amoníaco, amonio y urea contribuyen al equilibrio del pH ruminal, el amoníaco se absorbe principalmente en $\text{pH} > 7$ o es excretado por las células epiteliales ruminales, el amonio principalmente es absorbido a $\text{pH} < 6,8$ retirando un protón del rumen, y la urea es excretada mayormente a pH ácido, promovida por el aumento de AGV y CO_2 provenientes de un mayor crecimiento microbiano. El amoníaco egresa de la célula epitelial ruminal hacia la sangre donde es posteriormente metabolizado por el hígado para formar urea (Aschenbach *et al.*, 2011).

Para Fahey, Berger (1993) el procesado de los alimentos puede afectar la utilización de los carbohidratos estructurales en los rumiantes, al reducir el tamaño de partícula de los forrajes por molienda generalmente se mejora la performance del animal por un aumento del consumo voluntario.

El incremento de consumo y el tamaño pequeño de partícula, contribuyen al aumento de la tasa de pasaje a través del rumen, esto provoca una disminución de la digestión de los carbohidratos estructurales.

Al reducir el tamaño de partícula aumenta la superficie de ataque para las bacterias celulolíticas incrementando la tasa y la extensión de la digestión de la celulosa *in vivo*. Sin embargo el corto tiempo de retención en el rumen, causa la disminución de digestibilidad de la pared celular en forrajes y alimentos molidos.

Al presente, se observa frecuentemente que la productividad con ensilajes, es menor a la esperada o a la que se puede predecir a través de los análisis de laboratorio.

Para Di Marco (2005), la digestibilidad *in vitro* sobreestima la digestibilidad *in vivo* en un 15%, debido a que la técnica está estandarizada con un período incubación con licor ruminal de 48 horas en un tubo de ensayo. Este período de incubación excede el tiempo que el ensilaje es retenido en el rumen, que se estima en menos de 24 horas en vacas lecheras de alta producción.

En este sentido, Hoffman *et al.* (2003) al comparar periodos de incubación de 30 horas versus 48 horas, en la digestibilidad *in vitro* de la FDN del ensilaje de maíz, obtuvieron resultados que se diferenciaron en el orden de 8 a 9 unidades porcentuales de digestibilidad.

La digestibilidad de la FDN, es una función de la fracción potencial digestible, su tasa de digestión y la velocidad de paso por el rumen (Allen; Mertens, 1988). Si bien, Butler *et al.* (2001) concluyeron que los métodos de incubación por 48 hs *in vitro* tienen potencial para remplazar las técnicas *in situ*, donde se requieren animales modificados quirúrgicamente.

Para Varel; Kreikemeier (1995) al comparar las técnicas de digestibilidad *in situ* e *in vitro* (Tilley; Terry, 1963), observaron diferencias en el "lag time", en la tasa de digestión y la extensión de la digestión. Estas diferencias se las atribuyó a una mayor concentración de microorganismos en el rumen que en la técnica *in vitro*.

El ensilaje de planta entera de maíz posee una tasa de degradación *in situ* de la FDN, que según el momento de cosecha y procesado, varía entre el 3,19 % h⁻¹ a 3,95 % h⁻¹ (Johnson *et al.*, 2003). En contraste, los subproductos poseen una tasa variable de degradación de la FDN, raicilla de cebada 3,8 % h⁻¹ (Swain; Armentano, 1994), la pulpa de citrus 5,6 % h⁻¹ a 9,4 % h⁻¹ (Depeters *et al.*, 1997; Barrios-Urdaneta *et al.*, 2003) y la malta húmeda de 5 % h⁻¹ (Younker *et al.*, 1998).

Mertens (2010) sostiene que el tamaño de la partícula de la FDN, tiene importancia en el llenado ruminal y sobre el efecto del paso de la FDN en el animal. Los alimentos con menor cantidad de FDN, se desintegran con mayor rapidez debido a la masticación o la degradación ruminal, ocupan menos espacio en el rumen, poseen una alta tasa de pasaje y liberan espacio para un mayor potencial consumo de alimento.

Para Oba; Allen (1999), una mayor digestibilidad de la FDN del forraje, aumenta significativamente el consumo de materia seca (CMS) y la producción de leche. Un aumento de una unidad en la digestibilidad FDN *in vitro* o *in situ* se asocia con un aumento de 0,17 kg de CMS y un aumento de 0,25 kg de leche grasa corregida al 4%.

En la determinación del contenido total de nutrientes digestibles (TND) de forrajes, estimado por el sistema de predicción de energía NRC (2001). Se recomienda estimar la digestibilidad verdadera de la FDN, en una incubación *in vitro* por 48 horas.

Hoffman *et al.* (2003) compararon las digestibilidades de la FDN de distintos forrajes incubados *in vitro* por 30 y 48 horas. Utilizaron la DFDN para calcular los TND según el NRC (2001) y observaron sólo una variación de 1 a 3 unidades en los TND

de 30 y 48 horas. Además, plantean que la incubación *in vitro* a menores tiempos de 16 o 24 horas, para determinar la digestibilidad de FDN, limita su aplicación ya que poseen un error de laboratorio más grande que las incubaciones *in vitro* de 30 o 48 horas.

La energía digestible de los alimentos depende del porcentaje de TND, pero se debe asumir que las características en la forma de alimentación limitan la disponibilidad de energía de los alimentos.

Según Mertens (1987) se puede explicar la depresión en la digestibilidad de la FDN que se produce, cuando la tasa de pasaje se incrementa, debido a mayores niveles de consumo de alimento.

Para Mertens (2010), la ecuación de suma de Van Soest (Goering, Van Soest; 1970) describe la relación matemática de la DMS, la digestibilidad de la FDN (DFDN) y la digestibilidad de su contrario los solubles en detergente neutro (SDN) ($SDN = 100 - FDN$). La ecuación es $DMS = FDN \times DFDN + 0,98 \times SDN - 12,9$, que se puede reorganizar para demostrar $DMS = 87,1 - (0,98 - DFDN) \times FDN$.

Debido a que DFDN es menor que 0,98, esta ecuación indica una relación negativa entre la DMS y la FDN, y también sugiere que si se conoce la concentración FDN y su digestibilidad, se describe mejor la variación que más afecta la DMS. Lo que se relaciona con la energía del alimento que está disponible para el animal.

En algunas de las raciones mixtas, los SDN pueden tener una digestibilidad inferior a 0,98 principalmente donde la mayoría de los SDN es el almidón. Este problema, que se puede explicar por el ajuste hacia abajo del 0,98 dependiendo de la proporción y la digestibilidad del almidón de los SDN. Sin embargo, esto no niega la importancia primordial de la FDN en la DMS.

Por ejemplo: en una digestión *in vitro* a 48 h de una RCM, con una composición química del 39 % de FDN, se asume que la DFDN es del 50 % entonces resulta que la K_d es de $1,04 \text{ \% h}^{-1}$. Si se utiliza la ecuación, la DMS sería del 66,4 % con una concentración energética de $2,39 \text{ EM Mcal KgMS}^{-1}$.

En cambio, si se acorta el tiempo de la digestión *in vitro* a 24 h para mantener constante la DMS (66,4 %) y la DFDN (50 %), la tasa de digestión de la FDN debería aumentar a $2,08 \text{ \% h}^{-1}$. Ahora bien, si la K_d de la FDN se mantiene constante ($1,04 \text{ \% h}^{-1}$) al acortar el tiempo a 24 h, la DFDN disminuye al 25 % y la DMS es del 56,6 % con una concentración energética de $2,04 \text{ EM Mcal KgMS}^{-1}$. Finalmente, es evidente que la DFDN afecta a la DMS y esta a la concentración energética de la dieta.

Resumiendo, los productores lecheros en Argentina, emplean las RCM en los sistemas productivos debido a varios factores entre ellos se destacan, el aumento de carga por hectárea, la disponibilidad de pastura a lo largo del año, el tamaño del rodeo, encierres temporarios o permanentes de alimentación, factores climáticos en especial la sequía.

Unos de los principales ingredientes de las RCM es el ensilaje de planta entera de maíz. Este presenta algunas limitaciones en su ciclo productivo, la cosecha es estival, depende del clima para su cosecha, el rendimiento por hectárea determina el costo de la materia seca, etc.

El principal componente químico del ensilaje de maíz en la materia seca es la FDN, si bien, su porcentaje es muy estable en la composición de la materia seca, su digestibilidad determina la variación en la digestibilidad *in vivo* de la materia seca. Debido a numerosos factores como la calidad de la FDN per se, el ambiente ruminal, la tasa de digestión y de pasaje del rumen. Esta variación en la digestibilidad *in vivo*, condiciona la respuesta productiva de la vaca lechera.

Los subproductos agroindustriales en Argentina, son cada vez más accesibles para los productores lecheros. Estos están disponibles en distintas regiones del país. Se utilizan principalmente como ingredientes en RCM para vacas lecheras.

La composición química de los subproductos agroindustriales es bastante variable, en especial los porcentajes de materia seca, de proteína y de la FDN. El componente que más determina la digestibilidad *in vivo* de la materia seca es la FDN, al igual que el ensilaje de maíz se afecta por los mismos factores del proceso digestivo. La FDN de los subproductos agroindustriales posee un origen y una composición estructural diferente a la de la planta de maíz.

Los carbohidratos estructurales son la principal fuente de energía en los rumiantes. El sitio, la extensión y la cinética de digestión pueden afectar la cantidad y el perfil de nutrientes que son transportados a los tejidos centrales y periféricos, condicionando la respuesta animal y la eficiencia de producción.

Se requiere un análisis más integrado de la digestión de los carbohidratos, la producción de productos finales, y de las repuestas metabólicas y hormonales de la alimentación con RCM en vacas lecheras.

1.1. Hipótesis general.

En formulaciones de raciones completamente mezcladas iso energéticas, iso proteicas y de igual contenido de FDN. Una ración con subproductos agroindustriales aumenta la producción de leche en vacas lecheras, en comparación a una ración a base de ensilaje de planta entera de maíz, debido a la mayor degradación de la FDN de los subproductos.

1.2. Objetivo general.

Comparar raciones completamente mezcladas una a base de subproductos agroindustriales y otra a base de ensilaje de planta entera de maíz con iguales contenidos de fibra en detergente neutro, en términos de producción de leche y parámetros asociados a la digestión ruminal.

1.3. Objetivos específicos.

- I. Evaluación de ración con subproductos en vacas lecheras.
 - Conocer las respuestas productivas de vacas lecheras alimentadas con RCM.
 - Comparar el consumo de materia seca, energía metabolizable y el balance energético de las vacas lecheras que consumieron las RCM.
 - Conocer el efecto de las RCM sobre el perfil metabólico y hormonal de vacas lecheras.

- II. Evaluación de ración con subproductos sobre el ambiente ruminal de vacas lecheras fistuladas.
 - Establecer el efecto de las RCM sobre el ambiente ruminal de las vacas lecheras fistuladas.
 - Determinar la cinética de degradación de la FDN de raicilla de cebada y ensilaje de planta entera de maíz, en vacas lecheras fistuladas que consumen RCM.
 - Cuantificar la tasa de pasaje de FDN, marcada con cromo, por el tracto gastrointestinal en vacas lecheras fistuladas que consumen RCM.

III. Evaluación de ración con subproductos en fermentadores de doble flujo continuo.

- Comparar la digestibilidad aparente de los distintos componentes químicos de las RCM en fermentadores de doble flujo continuo.
- Describir el ambiente ruminal generado por las RCM en fermentadores de doble flujo continuo.

2. EVALUACIÓN DE RACIONES EN VACAS LECHERAS.

2.1. Materiales y métodos.

2.1.1. Lugar y fecha.

El trabajo se llevó a cabo en el tambo experimental (37°45´S, 58°18´O) de la unidad integrada Balcarce (Estación Experimental Agropecuaria Balcarce, INTA –Facultad de Ciencias Agrarias, UNMdP), provincia de Buenos Aires desde 12 de febrero al 19 marzo de 2010.

2.1.2. Tratamientos.

Los tratamientos consistieron en dos raciones completamente mezcladas (RCM), denominadas como RCM subproductos (RCM sub) y RCM ensilaje (RCM ens). Para la formulación de las RCM, se utilizaron los requerimientos metabólicos aportados por el programa Ración (INTA). La ración se formuló para vacas de 600 kg de peso vivo, 180 días de lactancia, producción de 25 litros y composición de leche 3,4 % de grasa. Se determinó que cada RCM debería aportar por vaca 55,5 Mcal EM día⁻¹, 8,28 kg de FDN día⁻¹, 3,42 kg de proteína día⁻¹ o una concentración energética 2,6 Mcal EM KgMS⁻¹, proteína 16 % KgMS⁻¹, 37 % de FDN. La formulación de cada RCM y los datos utilizados sobre calidad de alimentos se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. Raciones completamente mezcladas y la participación de cada alimento expresado en materia seca y las composiciones químicas de tabla empleadas para formular las raciones completamente mezcladas.

Tratamiento	Participación en cada RCM, % ^a	Componentes	MS ^b	DIVMS ^c	EM ^d	FDN ^e	PB ^f	N ^g	PDR ^h
	5	Pulpa de citrus	11,00	82,00	3,02	24,20	7,00	1,12	60,00
	14	Malta húmeda	31,00	66,30	2,39	52,00	26,50	4,24	60,00
	30	Raicilla de cebada	94,00	66,40	2,40	47,00	19,80	3,17	30,00
RCM Sub ⁱ	22	Germen de maíz	90,00	85,00	3,20	7,00	14,00	2,24	50,00
	13	Grano de cebada	88,70	87,50	3,16	15,00	10,00	1,60	50,00
	15,6	Rollo de avena	88,40	53,80	1,94	72,30	9,70	1,55	45,00
	0,4	Urea	99,99					44,00	99,00
	31	Ensilaje de maíz	40,00	68,50	2,47	45,70	6,20	0,99	75,00
	16	Raicilla de cebada	93,00	66,40	2,40	47,00	19,80	3,17	30,00
	14	Lechera 16	92,00	75,80	2,73	24,30	19,30	3,09	70,00
RCM Ens ^j	20	Grano de cebada	92,00	87,50	3,16	15,00	10,00	1,60	50,00
	12	Pellet de girasol	90,50	70,00	2,52	40,00	32,00	5,12	75,00
	6,2	Rollo de avena	88,40	53,80	1,94	72,30	9,70	1,55	45,00
	0,8	Urea	99,99					44,00	99,00

a, Expresado en materia seca. b, Materia seca. c, Digestibilidad *in vitro* de la materia seca. d, Energía metabolizable Mcal/KgMS = 4,4 x 0,82 x DIVMS. e, Fibra en detergente neutro. f, Proteína bruta. g, Nitrógeno. h, Proteína degradable en rumen. i, Ración completamente mezclada subproductos. j, Ración completamente mezclada ensilaje.

2.1.3. Animales y diseño experimental.

Se utilizaron veintiséis vacas Holando Argentino, multíparas de parición de primavera de 179 ± 29 días lactancia con un peso promedio vivo de 600 ± 43 kg. Estas tuvieron el mismo control sanitario que el resto del rodeo. Las vacas fueron agrupadas según el nivel de producción al inicio del período de acostumbramiento y asignadas al azar a cada tratamiento (13 vacas por tratamiento). Previo al período experimental las vacas se acostumbraron a las dietas por dos semanas, seguidas de tres semanas de período experimental.

Se utilizó un diseño completamente al azar con medidas repetidas en el tiempo.

2.1.4. Análisis químicos de las raciones completamente mezcladas.

Las dietas fueron analizadas en el Laboratorio de Nutrición de EEA Balcarce (INTA, Balcarce, Argentina). Para determinar la composición química de las RCM formuladas cada componente se almacenó a -24 °C. Posteriormente los componentes se secaron en estufa con circulación forzada de aire (60 °C durante 48 horas), los componentes con mayor cantidad de agua (hez de malta, pulpa de citrus y ensilaje de planta entera de maíz) se liofilizaron (Liofilizador L-A-B4, RIFICOR, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.). Las RCM tanto subproductos como ensilaje se elaboraron en base seca. Los alimentos fueron molidos con tamiz de 2 mm y mezclados después de molidos.

Los componentes de las RCM de origen agroindustrial, fueron provistos por Compañía de Alimentos (COMPAL, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina), el ensilaje de planta entera de maíz fue confeccionado en el año 2009 en el tambo experimental, el alimento balanceado de 16 % de PB de origen comercial (Ceres Tolva, Tandil, Buenos Aires Argentina. Insumos: Maíz 35 %; Cebada 14 %; Expeller soja 4 %; Pellet girasol 18 %; Afrechillo trigo 25,125 %; Conchilla 2 %; Oxido de Mg 0,15 %; Sal 1,5 %; Rumensín 0,025 %; Melaza 0,1 %; Núcleo vit-min. 0,1 %).

Se realizaron las siguientes determinaciones.

Materia seca (MS) por secado en estufa con circulación de aire forzado (60 °C durante 48 horas).

Materia orgánica (MO), por calcinación en mufla a 550 °C durante 3 horas.

Proteína bruta (PB) por combustión de la muestra en oxígeno ultra puro utilizando un analizador LECO FP 528 (LECO Corp., Saint Joseph, Missouri), según Horneck; Miller (1998).

Fibra en detergente neutro (FDN) con equipo ANKOM 200 (ANKOM Corp., Macedon, New York), según Komarek *et al.* (1994).

Fibra en detergente ácido (FDA) con equipo ANKOM 200 (ANKOM Corp., Macedon, New York), según Komarek *et al.* (1993).

Digestibilidad “*in vitro*” de la MS (DIVMS), utilizando un incubador DAISY II (ANKOM Corp., Macedon, New York), según Van Soest (1994 a).

Almidón (ALM) por método enzimático según Mc Rae; Armstrong (1968).

2.1.5. Alimentación y consumo de materia seca de las vacas.

Las vacas fueron alojadas individualmente en corrales experimentales. Las RCM se suministraron a la 8 h de la mañana posterior al ordeño. Los fines de semana la alimentación se realizó en dos corrales en forma grupal, uno por tratamiento. Las vacas se ordeñaron dos veces por día (mañana 6 h y tarde 16 h), finalizado éste, cada vaca se encerró en sus respectivos corrales.

Para la oferta de las RCM se estimó el consumo potencial en base a los resultados del programa Ración (INTA), estos se aumentaron un tercio para que las vacas consuman sin restricciones, 23,53 KgMS día⁻¹ a 30,57 KgMS día⁻¹. El consumo de materia seca de cada vaca fue obtenido de la diferencia entre el suministro y rechazo diarios en términos de materia seca. Esto se realizó cuatro días por semana para el período experimental.

Por lo tanto:

Consumo de RCM de las vacas (KgMS día⁻¹)= RCM ofrecida (KgMS día⁻¹) - RCM rechazada (KgMS día⁻¹)

2.1.6. Producción y composición de leche de las vacas.

La producción de leche se registró 5 días a la semana de lunes a viernes. Los análisis de composición de leche se hicieron dos días a la semana, sobre muestras diarias ponderadas por la producción en cada ordeño. En cada muestra se determinó el contenido de lactosa y proteína a través de un autoanalizador por espectrofotometría (Milko Scan, Foss Electric, Hillerod, Denmark). Para los valores de grasa el Milko Scan produjo errores erráticos por lo que no se presentan resultados. El promedio semanal de composición de la leche de cada vaca, se consideró como el valor de composición de leche para los cinco días de cada semana.

2.1.7. Estimación del peso vivo, balance energético y proteico de las vacas.

El peso vivo fue registrado al comienzo y al final del período experimental con el método de doble pesado con báscula electrónica. Para determinar la variación diaria de peso vivo por tratamiento, se calculó la diferencia del peso promedio final menos el peso promedio inicial dividido por el número de días transcurridos (21 días). Las formulas empleadas en la estimación del balance energético y proteico se observan en el apéndice I.

2.1.8. Metabolitos y hormonas plasmáticas de las vacas.

Al comienzo y final del período experimental, se tomaron muestras de sangre (punción de la vena yugular) en tubos conteniendo EDTA ($0,342 \text{ mol l}^{-1}$, pH 7,2, Laboratorio Wiener, Rosario, Argentina). La sangre fue centrifugada ($3000 \times g$ por 15 min a $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$) y el plasma se conservó a $-24 \text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta los análisis de metabolitos plasmáticos del inicio y final del período experimental: glucosa (Laboratorio Wiener, Rosario, Argentina), nitrógeno ureico (NU) (Laboratorio Wiener, Rosario, Argentina) y ácidos grasos no esterificados (Randox Laboratories Ltd., Crumlin, United Kingdom). Además, se determinó en el sangrado final del período experimental, las concentraciones hormonales de insulina, somatotrofina (b-GH) y somatomedinas (IGF-1) por radioinmuno análisis por el Instituto de Medicina y Biología Experimental (CONICET, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina).

2.1.9. Análisis estadístico.

El consumo diario de materia seca, el consumo de energía metabolizable, conversión del alimento en leche, la producción y la composición de la leche de las vacas lecheras y los metabolitos sanguíneos (AGNE, urea, glucosa) se analizaron como medidas repetidas en el tiempo, utilizando el PROC MIXED de SAS, según el siguiente modelo propuesto por Kaps; Lamberson (2004):

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

Donde: Y_{ijk} = variable dependiente ijk , μ = media general, T_i = efecto de tratamiento i , A_{ij} = el efecto aleatorio del animal j dentro del tratamiento i , S_k = efecto de la semana k , $T \times S_{ik}$ = efecto interacción tratamiento i y semana k , ε_{ijk} = error residual asociado a la ijk observación.

El término del error fue evaluado con varias matrices de varianzas y covarianzas, seleccionando la matriz que presentara menor criterio de información bayesiano (BIC) en cada variable (SAS, 2009).

La variación de peso vivo y las concentraciones de hormonas plasmáticas (somatotropina, somatomedina, insulina) de las vacas lecheras, se analizaron utilizando el programa PROC GLM de SAS, según el siguiente modelo:

$$Y_i = \mu + T_i + \varepsilon_i$$

Donde: Y_i = variable dependiente, μ = media general, T_i = efecto tratamiento, ε_i = error residual asociado a la i observación.

Las diferencias fueron consideradas significativas con un $P < 0,05$. Todos los resultados están expresados como medias de cuadrados mínimos, se ajustaron por comparaciones múltiples Tukey-Kramer y se expresó el error estándar de la media (EEM).

2.2. Resultados.

2.2.1. Composición química de las raciones completamente mezcladas.

La composición química de las RCM utilizadas se presenta en la Tabla 2. La concentración energética obtenida fue 8 % menor y la proteína bruta y FDN fueron un 6% mayor a los requerimientos estimados al comienzo del ensayo.

Tabla 2. Características (promedio \pm desvío estándar) de las raciones completamente mezcladas ofrecidas a las vacas lecheras.

	Tratamientos	
	RCM sub ^a	RCM ens ^b
% MS ^c	55,55 \pm 7,01	65,26 \pm 8,12
% DIVMS ^d	66,14 \pm 0,50	67,33 \pm 0,81
% MO ^e	93,70 \pm 1,57	92,50 \pm 0,36
% PB ^f	17,05 \pm 0,55	16,52 \pm 1,05
% FDN ^g	39,17 \pm 0,45	39,97 \pm 1,43
% FDA ^h	15,33 \pm 0,06	17,97 \pm 0,87
% ALM ⁱ	24,63 \pm 3,23	26,37 \pm 2,50
% CSA ^j	15,23 \pm 1,42	14,53 \pm 1,56
% EE ^l	3,37 \pm 0,21	1,70 \pm 0,20
EM Mcal KgMS ⁻¹ k	2,38 \pm 0,02	2,43 \pm 0,03

a, Ración completamente mezclada subproductos. b, Ración completamente mezclada ensilaje. c, Materia seca. d, Digestibilidad “*in vitro*” de la materia seca. e, Materia orgánica. f, Proteína bruta. g, Fibra en detergente neutro h, Fibra en detergente ácido. i, Almidón. h, Carbohidratos solubles en agua. j, Extracto etéreo. k, Energía metabolizable = 4,4 Mcal KgMS⁻¹ x 0,82 x DIVMS.

2.2.2. Variación del peso vivo de las vacas, consumo de materia seca, producción y composición de leche.

En la Tabla 3, se presentan los resultados productivos de los tratamientos RCM sub y RCM ens.

Tabla 3. Efecto de dos dietas RCM sub y RCM ens, sobre el consumo de materia seca y energía metabolizable, conversión, la variación de peso vivo diario, la producción y composición de leche en vacas lecheras.

	Tratamientos			Valor P		
	RCM sub ^a	RCM ens ^b	EEM ^c	T ^d	S ^e	TxS ^f
Consumo de materia seca*, kg Ms día ⁻¹	24,82	24,15	0,13	0,07	0,93	0,03
Consumo de energía metabolizable*, Mcal día ⁻¹	59,82	60,63	0,32	0,37	0,93	0,03
Conversión*, kg Ms : l leche	1,05	1,04	0,01	0,84	0,19	0,39
Producción de leche*, l día ⁻¹	25,95	24,88	0,25	0,56	0,05	0,01
Lactosa de la leche*, gr cada 100 gr	4,66	4,67	0,01	0,84	0,99	0,99
Proteína de la leche*, gr cada 100 gr	3,51	3,55	0,01	0,71	0,91	0,99
Variación peso vivo diario**, kg	-0,05	-0,62	0,24	0,11		

Nivel de significancia 5 %. *PROC MIXED, **PROC GLM. Valores expresados como medias de cuadrados mínimos. a, Ración completamente mezclada subproductos. b, Ración completamente mezclada ensilaje. c, Error estándar de la media. d, Tratamientos. e, Semanas. f, Interacción tratamientos x semanas.

Para el consumo de materia seca, consumo de energía metabolizable y la producción de leche el efecto interacción fue significativa. Los resultados de la interacción tratamiento por semana se presentan en la Tabla 4.

Tabla 4. Efecto de dos dietas RCM sub y RCM ens, sobre la interacción tratamientos por semanas, del consumo de materia seca, la energía metabolizable y la producción de leche en vacas lecheras.

	Tratamientos		EEM ^c	Valor P
	RCM sub ^a	RCM ens ^b		TxS ^d
Consumo de materia seca*, kg Ms día⁻¹				
Semana 1	25,03	24,06	0,22	0,06
Semana 2	25,08	23,79	0,22	0,01
Semana 3	24,34	24,60	0,22	0,60
Consumo de energía metabolizable*, Mcal día⁻¹				
Semana 1	60,34	60,39	0,54	0,96
Semana 2	60,45	59,73	0,54	0,56
Semana 3	58,67	61,76	0,57	0,01
Producción de leche*, l día⁻¹				
Semana 1	25,55	25,06	0,42	0,79
Semana 2	26,95	24,74	0,45	0,23
Semana 3	25,36	24,85	0,47	0,78

Nivel de significancia 5 %. *PROC MIXED. Valores expresados como medias de cuadrados mínimos. a, Ración completamente mezclada subproductos. b, Ración completamente mezclada ensilaje. c, Error estándar de la media. d, Interacción tratamientos x semanas.

La totalidad de las variables analizadas no presentaron diferencias para el efecto principal tratamiento. Sin embargo, las tres variables presentaron diferencia ($p < 0,05$) para el efecto interacción tratamiento por semana. El consumo de materia seca fue superior ($p < 0,01$) para RCM sub en la semana 2, y el consumo de energía metabolizable fue superior para RCM ens en la semana 3 ($p < 0,01$) y la producción de leche no presentó diferencias entre los tratamientos dentro de las semanas.

2.2.4. Comparación del consumo de materia seca con el NRC (2001) y el balance energético y proteico de las vacas alimentadas con raciones completamente mezcladas.

En la tabla 5, se presenta la comparación del consumo estimado por el Nutrient Requirements of Dairy Cattle, NRC (2001) y el observado en las vacas.

Tabla 5. Comparación del consumo de materia seca de las vacas para los tratamientos RCM sub y RCM ens y los estimados según el Nutrient Requirements of Dairy Cattle, NRC 2001.

	Ensayo I		NRC 2001	
	RCM sub ^b	RCM ens ^c	RCM sub	RCM ens
Peso vivo promedio de las vacas, Kg	572,81	598,72	572,81	598,72
Producción de leche, l día ⁻¹	25,96	24,88	25,96	24,88
Leche grasa corregida 4 % ^a , l día ⁻¹	23,62	22,64	23,62	22,64
Consumo de MS, KgMS día ⁻¹	24,82	24,15	20,10	20,12

a, Para estimar la leche grasa corregida se consideró un 3,4 % de grasa en la leche de las vacas. b, Ración completamente mezclada subproductos. c, Ración completamente mezclada ensilaje.

El consumo de materia seca observado fue en promedio un 22 % mayor al estimado por medio de la ecuación propuesta por el NRC (2001) para el consumo de materia seca.

En la Tabla 6, se presentan los resultados del balance energético de las vacas lecheras, utilizando los promedios obtenidos del ensayo de las vacas lecheras, del peso vivo, consumo de materia seca, producción de leche y cambio de peso vivo.

Tabla 6. Efecto de dos dietas RCM sub y RCM ens, sobre el balance energético de las vacas estimado según Nutrient Requirements of Dairy Cattle, NRC (2001).

	Tratamientos	
	RCM sub ^a	RCM ens ^b
Peso vivo promedio de las vacas, Kg	572,81	598,72
Producción de leche, l día ⁻¹	25,96	24,88
Total nutrientes digestible, % MS*	66,14	67,33
Energía Digestible, Mcal KgMS ⁻¹ *	2,83	2,93
Energía Metabolizable, Mcal KgMS ⁻¹ *	2,41	2,51
ENI, Mcal KgMS ⁻¹ *	1,66	1,57
Aportes dieta ENI, Mcal día ⁻¹ *	41,27	37,95
Requerimientos totales ENI, Mcal día ⁻¹ *	32,92	32,46
Balance de Energía Neta lactancia, Mcal día ⁻¹ *	8,59	8,41
Exceso de energía (%)	21%	22%

a, Ración completamente mezclada subproductos. b, Ración completamente mezclada ensilaje. *Valores estimados según Nutrient Requirements of Dairy Cattle, NRC (2001).

El balance energético es positivo para ambas RCM, el exceso de energía para los dos tratamientos promedio el 21,5 %. Sin embargo, este exceso de energía no se reflejó en la disminución de la pérdida de peso y en un aumento de producción de leche.

En la tabla 7, se presenta el balance proteico de las vacas que consumieron las RCM sub y RCM ens.

Tabla 7. Efecto de dos dietas RCM sub y RCM ens, sobre el balance proteico de las vacas estimado según Nutrient Requirements of Dairy Cattle, NRC (2001).

	Tratamientos	
	RCM sub ^a	RCM ens ^b
Peso vivo promedio de las vacas, Kg	572,81	598,72
Producción de leche, l día ⁻¹	25,96	24,88
Consumo de MS, KgMS día ⁻¹	24,82	24,15
Alimento Proteína Bruta, % MS	17,1	16,5
Aporte dietario PB, g día ⁻¹	4244,22	3984,75
Proteína metabolizable suministrada, g día ^{-1*}	3216,45	2585,99
Proteína metabolizable requerida, g día ^{-1*}	2412,52	2187,97
Balance proteína metabolizable, g día ^{-1*}	803,93	398,02
PDR suministrada, g día ^{-1*}	2047,10	2562,07
PDR requerida, g día ^{-1*}	2466,16	2451,93
Balance PDR, g día ^{-1*}	-419,06	110,14
PNDR suministrada, g día ^{-1*}	2197,12	1422,68
PNDR requerida, g día ^{-1*}	1192,21	925,16
Balance de PNDR, g día ^{-1*}	1004,91	497,52

a, Ración completamente mezclada subproductos. b, Ración completamente mezclada ensilaje. *, Valores estimados según Nutrient Requirements of Dairy Cattle, NRC (2001).

El balance proteico de las vacas que recibieron las RCM sub y RCM ens, fue positivo. El consumo de proteína metabolizable para ambas RCM fue positivo. En cambio el balance de PDR para RCM sub fue negativa y no así para RCM ens. El balance de las PNDR fue positivo para las dos RCM.

2.2.5. Hormonas y metabolitos sanguíneos de las vacas.

En la Tabla 8, se presentan los resultados para las concentraciones sanguíneas de hormonas y metabolitos de las vacas lecheras.

Tabla 8. Efecto de dos dietas RCM sub y RCM ens, sobre las concentraciones plasmáticas de hormonas y metabolitos de las vacas lecheras.

	Tratamientos			Valor P		
	RCM sub ^a	RCM ens ^b	EEM ^c	T ^d	P ^e	T x P ^f
Hormonas						
b-GH ^{g*} , ng ml ⁻¹	3,21	4,27	0,91	0,46		
IGF-1 ^{h*} , ng ml ⁻¹	252,5	227,0	23,98	0,44		
Insulina [*] , ng ml ⁻¹	0,36	0,42	0,068	0,53		
Metabolitos						
AGNE ^{i**} , meq l ⁻¹	220	193,2	7,51	0,22	0,92	0,24
BUN ^{j**} , mg dl ⁻¹	8,47	7,36	0,26	0,04	0,75	0,64
Glucosa ^{**} , mg dl ⁻¹	86,89	87,61	2,17	0,89	0,08	0,06

Nivel de significancia del 5%. *Proc glm, **Proc mixed. Valores expresados como medias de cuadrados mínimos. a, Ración completamente mezclada subproductos. b, Ración completamente mezclada ensilaje. c, Error estándar de la media. d, Tratamiento. e, Período. f, Tratamiento por período. g, Somatotropina. h, Somatomedina. i, Ácidos grasos no esterificado. j, Nitrógeno ureico en sangre.

Los valores de las hormonas al final del ensayo no presentaron diferencias entre tratamientos. Los promedios de ácidos grasos no esterificados en los niveles observados no presentaron diferencias, igual a lo observado con la pérdida de peso. Sin embargo, la magnitud de pérdida de peso en términos relativos fue mayor para RCM ens, sin evidenciarse una mayor movilización de AGNE. El nitrógeno ureico en sangre presentó diferencias entre tratamientos siendo superior para RCM sub. Los valores de glucosa observados son normales para este tipo de dieta y no presentaron diferencias entre tratamientos. Se observó una tendencia a que la interacción tratamiento por periodo sea significativa, siendo los niveles para RCM sub (semana 1, 78,38 mg dl⁻¹; semana 3, 95,39 mg dl⁻¹) y RCM ens (semana 1, 87,77 mg dl⁻¹; semana 3, 87,44 mg dl⁻¹).

3. EVALUACIÓN DE RACIONES EN VACAS LECHERAS FISTULADAS.

3.1. Materiales y métodos.

3.1.1. Lugar y fecha.

El trabajo se llevó a cabo en el tambo experimental (37°45'S, 58°18'O) de la unidad integrada Balcarce (Estación Experimental Agropecuaria Balcarce, INTA–Facultad de Ciencias Agrarias, UNMDP), provincia de Buenos Aires desde el 12 de febrero al 6 de abril del 2010.

3.1.2. Tratamientos.

Para el ambiente ruminal de las vacas fistuladas, los tratamientos fueron las dietas con que se alimentaron las vacas lecheras (RCM sub y RCM ens).

Para la cinética de digestión de la FDN, los tratamientos se definieron como el alimento que más fibra en detergente neutro aportará dentro de cada RCM. En la RCM sub fue raicilla de cebada y en la RCM ens fue ensilaje de planta entera de maíz. Estos fueron secados y molidos hasta pasar por malla de 2 mm.

3.1.3. Animales y diseño experimental.

Para ambiente ruminal se utilizaron 4 vacas multíparas, provistas de cánula ruminal, con un peso de 575 ± 67 kg. Estas recibieron el mismo control sanitario que el resto del rodeo. Se utilizó un diseño “cross over” 2x2 replicado.

Para la determinación de la tasa de pasaje de las RCM se utilizó un diseño completamente aleatorio con tres vacas por tratamiento.

3.1.4. Alimentación.

Las vacas fueron colocadas en corrales individuales y se les administró las mismas RCM que a las vacas lecheras de ensayo I. El manejo de horarios de suministro de alimento y ordeño fue similar a dicho ensayo.

3.1.5. Período experimental.

Para el ambiente ruminal las vacas se acostumbraron por 15 días a las RCM, seguido de dos períodos de ensayos. El primer período de mediciones fue de 5 días. Terminado éste se realizó un intercambio del 95 % contenido ruminal, para permitir un acostumbramiento más rápido de la flora ruminal e intestinal a las RCM (Satter; Bringe, 1969; Weimer *et al.*, 2010). En el segundo período, el acostumbramiento duró ocho días y luego se realizaron 5 días de mediciones. Posterior a este se realizó la medición de la tasa de pasaje de las RCM, con 15 días de acostumbramiento de las vacas a las RCM, más 5 días de mediciones.

3.1.6. Evaluación y registro de cinética de degradación, ambiente ruminal y tasa de pasaje de las RCM.

3.1.6.1. Cinética de degradación de la fibra en detergente neutro.

En el 1º día de los periodos de mediciones se incubaron las bolsas de dacrón (10x30 cm porosidad $\pm 56 \mu$) en el rumen para el estudio de la tasa y extensión de la degradación de la fibra en detergente neutro de raicilla de cebada (RCM sub) y ensilaje de planta entera de maíz (RCM ens) y en las vacas que recibían la RCM sub se colocó raicilla de cebada en las bolsitas de dacrón y en la RCM ens el ensilaje de planta entera de maíz.

La raicilla de cebada y ensilaje de planta entera de maíz se secó en estufa con circulación forzada de aire (60 °C durante 48 horas), molidas a 2 mm y se determinó el contenido de FDN (Komarek *et al.*, 1994). Se colocó 5 g de Ms en cada bolsa de dacrón previamente tarada, se las incubó en el saco ventral del rumen por duplicado durante 0, 3, 6, 9, 15, 24, 36, 48, 72 y 102 h, a partir de las 5:00 h del 1º día del periodo de mediciones, las bolsas fueron colocadas todas juntas en una bolsa tipo cebollera de 35 x 45 cm, asegurando de esta manera la misma ubicación de todas las bolsas dentro del rumen, las bolsas se retiraban en los horarios establecidos.

Luego de cada extracción, las bolsas se colocaron en un balde con agua fría, posteriormente se congelaron a -24°C hasta el final del periodo. Posteriormente, se descongelaron y lavaron exteriormente bajo corriente de agua fría a fin de arrastrar el material soluble y el contaminante, hasta obtener un líquido incoloro (Mehrez; Orskov, 1977). Las bolsas de la hora 0 se incubaron durante 15 minutos en agua a 39 °C,

posteriormente se manejaron como el resto de las bolsas. Luego todas las bolsas se secaron en estufa con circulación forzada de aire (60°C durante 48 h) hasta peso constante, a continuación se pesaron para determinar el contenido de MS del residuo. Dicho contenido residual se extrajo de las bolsas de dacrón y se realizó un pool de los duplicados dentro de cada periodo, tratamiento, vaca y horario, para determinar el contenido de FDN según Komarek *et al.* (1994).

La cinética de desaparición ruminal de la FDN de la raicilla de cebada y del ensilaje de planta entera de maíz, se estimó mediante el modelo de McDonald (1981) utilizando método Marquadt para modelos no lineales de PROC NLIN de SAS.

$$y = a + b (1 - e^{-[kd*(t-tr)]})$$

Donde: y = degradabilidad (%) en tiempo t, a = fracción soluble % (FS %), b = fracción degradable % (FD %), e = base de logaritmo natural, kd = tasa fraccional de degradación (% hora⁻¹), t= tiempo de incubación (h), tiempo de retardo (tr) = horas (h).

La degradación efectiva de la FDN (DEFDN) fue calculada con la siguiente ecuación:

$$DEFDN = a + (b \cdot kd / (kd + kp)) e^{-((kd + kp)tr)}$$

Para raicilla de cebada y ensilaje de planta entera de maíz se estimó la DEFND con distintas tasas de pasajes a 12 h = kp 8,33 % h⁻¹, 24 h = kp 4,16 % h⁻¹, 36 h = kp 2,77 % h⁻¹, 48 h = kp 2,08 % h⁻¹

3.1.6.2. Ambiente ruminal de las vacas lecheras fistuladas.

Para evaluar el ambiente ruminal, se extrajeron 100 ml de licor ruminal del saco dorsal y ventral del rumen de cada vaca fistulada, cada tres horas, comenzado el muestreo a la 5:00 h del 1^{er} día del periodo de mediciones con la siguiente frecuencia de 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18 y 21 h. Sobre estas muestras se registraron los valores de pH inmediatamente después de extraído el licor ruminal y previo filtrado con tela tipo quesería, con un pH-metro digital portátil con electrodo combinado Digi-Sense (Cole-Palmer, Vernon Hills, USA). De 100 ml de licor ruminal filtrado se tomaron dos alícuotas, una para determinar nitrógeno amoniacal (N-NH₃) donde se pipetearon 4 ml de licor ruminal y se mezclaron con un acidificante (4 ml de ácido clorhídrico 0,2 molar)

y otra muestra para determinar ácidos grasos volátiles (AGV). Se pipetearon 9,9 ml de licor ruminal y se mezclaron con acidificante (0,1 ml de ácido sulfúrico), se almacenaron a -24°C hasta las determinaciones de N-NH₃ y de los AGV. Las muestras fueron descongeladas y centrifugadas (8000 x g por 15 minutos a 4°C) y se determinaron sobre el sobrenadante la concentración de N-NH₃ según lo descripto por Chaney; Marbach, (1962). Para la determinación de la concentración de AGV las muestras se enviaron congeladas y refrigeradas al laboratorio LASERNU (UBA, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina) donde utilizaron para la determinación lo descripto por Friggens *et al.* (1998).

Para calcular el tiempo debajo de pH menor a 6, se realizó una regresión no lineal con una función logística acumulativa del tiempo en función del pH, con los valores de pH de cada vaca por período. Según lo descripto por Alzahal *et al.* (2007). La curva logística depende de tres parámetros que describen β_0 la pendiente, β_2 el límite de tiempo superior, β_1 es el punto de inflexión de la curva.

$$y = \frac{\beta_2}{1 + \exp[-\beta_0 \times (x - \beta_1)]}$$

El eje y representa el tiempo acumulado (min día⁻¹) por cada punto de pH en el eje x. Los valores del eje x representan el pH ruminal. El límite de tiempo superior de la curva logística es de 1440 min día⁻¹, los valores de pH en el eje x comienzan en 4,5 y terminan en 7,5.

3.1.6.3. Tasa de pasaje de sólidos.

Se utilizó la técnica de fibra marcada con cromo según lo descripto por Uden *et al.* (1980). Una muestra de ensilaje de planta entera de maíz se trató con un detergente neutro para obtener fibra pura. El residuo resultante de esta digestión fue tratado con una solución de dicromato de sodio a 100 °C durante 24 h, el que posteriormente fue reducido a sesquióxido de cromo mediante el agregado de ácido ascórbico por 1 h. Posteriormente se escurrió y se colocó en estufa a 65 °C hasta obtener peso constante. Cien gramos de la fibra marcada fueron introducidos en el rumen en un sólo pulso al comenzar el muestreo, a las 5 h. Se utilizaron tres vacas por tratamiento. Las muestras de materia fecal se tomaron directamente del recto en los horarios 0, 15, 18, 21, 24, 30, 36, 42, 48, 60, 72, 84, 102, 120 h. Las muestras extraídas se congelaron a -24°C hasta su procesamiento. Después de terminado el muestreo se secaron en

estufa con circulación forzada de aire a 65 ° C hasta obtener peso constante, una vez secas y molidas (1 mm) se realizó análisis de cromo por espectrofotometría de absorción atómica.

El modelo matemático usado y su significado biológico fue el descrito por Grovum; Williams (1973). La concentración del marcador fecal presenta dos pendientes una ascendente y otra descendente, la descendente representa el recambio ruminal y la ascendente el pasaje post ruminal.

El modelo es de dos compartimientos: uno de mezcla y otro tubular. En términos matemáticos dos exponenciales y un tiempo de retardo.

$$Y = A e^{-k_1(t-TT)} - A e^{-k_2(t-TT)} \quad \text{si } t > TT$$

$$Y = 0 \quad \text{si } t < TT$$

Y, A: es la concentración del marcador en la MS fecal. El significado biológico de A no está definido.

K1: es una medida precisa de la velocidad fraccional de pasaje del marcador por el retículo rumen (RR). El tiempo promedio de este compartimiento es de $1/k_1 = TRR$.

K2: su significado cuantitativo es algo incierto. Su significado cualitativo, es que un buen indicador de la velocidad fraccional del pasaje del marcador a través del ciego y colon proximal ya que su cinética de primer orden se aplica a la eliminación del marcador desde este sitio. Además, en un modelo físico del tracto digestivo, k2 predice exactamente la velocidad de recambio en el ciego-colon proximal. El tiempo de retención en este compartimiento es $1/k_2 = TRC$.

TT: el tiempo de tránsito del marcador a través del omaso, intestino delgado y la parte distal del intestino grueso. Es el tiempo de que una partícula del marcador demora en aparecer en desde el sitio de introducción al sitio de muestreo. Gráficamente es el tiempo desde que el marcador se incrementa desde cero.

t: es el tiempo desde que fue suministrado el marcador.

Los compartimientos TRR y TRC son considerados de mezcla, en ellos una vez suministrado el marcador se difunde en todo el volumen e inmediatamente comienza a salir, mientras que el compartimiento TT es tubular, en éste el marcador tiene que migrar, desde un extremo al otro, para recién salir de este sitio.

El tiempo total promedio de retención en el tracto gastrointestinal (TTPR) fue calculado de la siguiente forma:

$$\text{TTPR} = \text{TRR} + \text{TRC} + \text{TT}^{\text{a}}$$

^a el TT se consideró fijo a 9 horas según los resultados obtenidos.

Para el cálculo de los parámetros del modelo se utilizó el programa de CINÉTICA DE LA DIGESTIÓN EN RUMINANTES-PROGRAMAS DE COMPUTACIÓN (CIDIR-PC) versión 1.0 realizado por Fernández (1990). Se estimó para cada vaca los parámetros y se calculó para cada tratamiento por PROC GLM las medias de cuadrados mínimos de los tratamientos.

3.1.7. Análisis estadístico

Los niveles de pH y las concentraciones de AGV y N-NH₃ en líquido ruminal de las vacas fistuladas, se analizaron como medidas repetidas en el tiempo, utilizando el PROC MIXED de SAS según el siguiente modelo:

$$Y_{ijkl} = \mu + \tau_i + \delta_{ij} + t_k + \beta_l + (\tau \times t)_{ik} + \varepsilon_{ijkl}$$

Donde: Y_{ijkl} = variable dependiente, μ = media general, τ_i = efecto tratamiento, δ_{ij} = el efecto aleatorio de la vaca j dentro del tratamiento i , t_k = efecto hora k , β_l = efecto periodo l , $(\tau \times t)_{ik}$ = efecto interacción tratamiento \times hora ij , ε_{ijkl} = error residual asociado a la $ijkl$ observación.

El término del error fue evaluado con varias matrices de varianzas y covarianzas, seleccionando la matriz que presentara menor BIC en cada variable (SAS, 2009).

Los minutos debajo de pH de 6 y los parámetros del modelo de cinética de degradación de la fibra en detergente neutro y la degradabilidad efectiva se compararon, con PROC GLM de SAS, utilizando el siguiente modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + A_j + P_k + \varepsilon_{ijk}$$

Donde: Y_{ijk} = variable dependiente, μ = media general, T_i = efecto tratamiento, A_j = efecto vaca, P_k = efecto periodo, ε_{ijk} = error residual asociado a la ijk observación.

Los parámetros de tasa de pasaje de cada tratamiento se compararon, con PROC GLM de SAS, utilizando el siguiente modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + \varepsilon_{ij}$$

Donde: Y_i = variable dependiente, μ = media general, T_i = efecto tratamiento.

Las diferencias fueron consideradas significativas con un $P < 0,05$. Todos los resultados están expresados como medias de cuadrados mínimos, se ajustaron por comparaciones múltiples Tukey-Kramer y se informó el error estándar de la media (EEM).

3.2. Resultados.

3.2.1. Parámetros de ambiente ruminal de las vacas lecheras fistuladas.

En la tabla 9, se muestran los resultados del ambiente ruminal de las vacas que consumieron RCM sub y RCM ens.

Tabla 9. Efecto de dos dietas RCM sub y RCM ens, sobre el pH, nitrógeno amoniacal y concentraciones de ácidos grasos volátiles en líquido ruminal de vacas fistuladas.

	Tratamientos		EEM ^c	T ^d	P ^e	Valor P		
	RCM sub ^a	RCM ens ^b				A ^f	H ^h	T*H ^h
pH	5,97	6,20	0,07	0,27	0,03		>0,01	0,99
Minutos < pH 6, min día ⁻¹	910	638	87,85	0,21	0,08	0,73		
N-NH ₃ ^g , mg dl ⁻¹	33,17	30,49	2,48	0,65	0,01		0,01	0,63
Total AGV ^h , mmol l ⁻¹	94,25	90,12	3,49	0,46	>0,01		>0,01	0,95
Acético:propiónico	3,36	3,86	0,12	0,21	0,26		0,07	0,89
Acético, mmol l ⁻¹	65,68	64,00	2,32	0,77	>0,01		>0,01	0,80
Propiónico, mmol l ⁻¹	19,81	17,43	0,89	0,60	0,05		0,01	0,97
Butírico, mmol l ⁻¹	8,81	8,68	0,43	0,86	0,05		0,06	0,65

Nivel de significancia del 5 %. Valores expresados como medias de cuadrados mínimos. a, Ración completamente mezclada subproducto. b, Ración completamente mezclada ensilaje. c, error estándar de la media. d, Tratamientos. e, Periodos. f, vaca. g, horas. h, Interacción tratamiento por hora. h, Nitrógeno amoniacal.

Las variables del ambiente ruminal, no presentaron diferencias entre tratamientos. El pH, N-NH₃ y AGV presentaron diferencias entre los periodos. Siendo el pH (6,34; 5,97), N-NH₃ (21,06; 42,51, mg dl⁻¹) y el total de AGV (80,55; 103,82, mM l⁻¹) y acético (52,52; 77,16, mM l⁻¹) para los periodos 1 y 2, respectivamente.

Los minutos debajo de pH 6 presentaron una tendencia en el efecto periodo siendo el primero de 531 min día⁻¹ y el segundo de 1018 min día⁻¹.

3.2.2. Cinética de digestión de la fibra en detergente neutro de raicilla de cebada y ensilaje de planta entera de maíz.

En la tabla 10, se muestran los resultados de la cinética de digestión de la FDN de raicilla de cebada y ensilaje de planta entera de maíz.

Tabla 10. Efecto de dos dietas RCM sub y RCM ens, sobre la cinética de digestión de la fibra en detergente neutro de ensilaje de planta entera de maíz y raicilla de cebada en vacas fistuladas.

Parámetros	Tratamiento		EEM ^a	Valor P		
	Raicilla	Ensilaje		T ^b	V ^c	P ^d
Fracción soluble, %	4,59	9,54	1,29	0,02	0,11	0,06
Fracción degradable, %	66,75	67,88	0,92	0,56	0,37	0,45
Degradación potencial, %	71,34	77,43	1,43	0,02	0,17	0,38
Tasa de degradación por hora, %	3,68	1,99	0,03	0,10	0,87	0,71
Tiempo de retardo, h	1,49	8,28	1,55	0,04	0,69	0,12
Degradación efectiva FDN, % h ⁻¹						
12 h = kp ^e 8,3 % h ⁻¹	21,63	15,38	1,83	0,13	0,85	0,15
24 h = kp 4,1% h ⁻¹	32,19	22,87	2,38	0,11	0,95	0,22
36 h = kp 2,7% h ⁻¹	38,81	28,67	2,52	0,10	0,96	0,23
48 h = kp 2,0% h ⁻¹	43,35	33,16	2,49	0,10	0,94	0,23

Nivel de significancia 5 %. Valores expresados como medias de cuadrados mínimos. a, Error estándar de la media. b, Tratamiento. c, Vaca. d, Período. e, Tasa de pasaje.

Los parámetros de la cinética de degradación de la FDN que presentaron diferencias ($P < 0,05$) fueron la fracción soluble, la degradación potencial y el tiempo de retardo, siendo los porcentajes mayores para FDN de ensilaje de planta entera de maíz. La fracción degradable no presentó diferencias ($P > 0,05$). La tasa de degradación por hora y la degradación efectiva de la FDN en las horas 36 y 48 presentó tendencia ($P = 0,10$) a ser mayor para raicilla de cebada.

En la figura 1, se muestra la degradabilidad efectiva de la FDN de raicilla de cebada y ensilaje de planta entera de maíz con distintas tasas de pasajes.

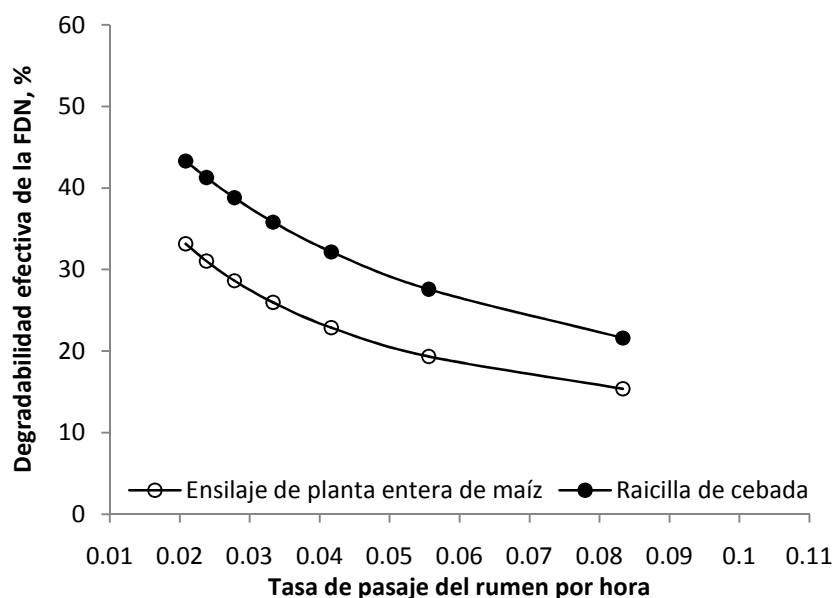


Figura 1. Degradación efectiva de la FDN de raicilla de cebada y ensilaje de planta entera de maíz a diferentes tasas de pasajes del rumen.

3.2.3. Tasa de pasaje de sólidos de las raciones completamente mezcladas en el tracto gastrointestinal.

Los resultados de la tasa de pasaje de sólidos se muestran en la tabla 11, para los tiempos de retención en el compartimiento de mezclado, tubular y total de los tratamientos RCM sub y RCM ens.

Tabla 11. Efectos de dos dietas RCM sub y RCM ens, sobre el tiempo de retención en los distintos compartimientos del tracto digestivo de vacas fistuladas.

	Tratamiento		EEM ^c	Valor P
	RCM sub ^a	RCM ens ^b		
TRR ^d , h	39,65	36,43	7,53	0,77
TRC ^e , h	16,42	16,51	1,63	0,95
TT ^f , h	9	9		
TTPR ^g , h	65,05	61,95	8,47	0,87

Nivel de significancia 5 %. Valores expresados como medias de cuadrados mínimos. a, Ración completamente mezclada subproductos. b, Ración completamente mezclada ensilaje. c, Error estándar de la media. d, Tiempo de retención del rumen. e, Tiempo de recambio del ciego y colon. f, Tiempo de tránsito de omaso, intestino delgado y la parte distal del intestino grueso. g, Tiempo total promedio de retención.

Los tiempos de retención en rumen, el tiempo de recambio del ciego y colon, el tiempo total promedio de retención no presentaron diferencias entre tratamientos.

4. EVALUACIÓN DE RACIONES EN FERMENTADORES DE DOBLE FLUJO CONTINUO.

4.1. Materiales y métodos.

4.1.1. Lugar y fecha.

El trabajo, se llevó a cabo en el Laboratorio de Fermentadores del departamento de Producción Animal de la Unidad Integrada Balcarce (Estación Experimental Agropecuaria Balcarce, INTA–Facultad de Ciencias Agrarias, UNMdP), provincia de Buenos Aires, desde el 6 al 28 setiembre de 2010.

4.1.2. Tratamientos y diseño experimental.

Se utilizaron dos tratamientos, RCM subproductos y RCM ensilaje, de las vacas lecheras.

Los alimentos fueron los mismos que se utilizaron en el experimento de las vacas lecheras. Las muestras de cada alimento fueron tomadas y congeladas durante el ensayo de las vacas. Posteriormente se secaron en estufa con circulación de aire forzado (60 °C durante 48 horas) y se liofilizaron los alimentos con mayor cantidad de agua (hez de malta, pulpa de citrus y ensilaje de planta entera de maíz). Las RCM tanto subproductos como ensilaje se elaboraron en base seca. Los alimentos fueron molidos con tamiz de 2 mm y mezclados en hormigonera profesional durante 20 minutos.

El patrón de alimentación de los fermentadores fue el siguiente: se administraron diariamente 90 g de MS por cada fermentador, divididos en dos alícuotas de 45 g de MS en los horarios de 7 h y 19 h.

El diseño fue un “cross over” 2x2 replicado. El periodo experimental consistió en dos periodos cada uno de seis días de acostumbramiento y 72 horas de mediciones comenzando el primer día a las 7 h y terminando a las 7 h del cuarto día.

4.1.3. Fermentadores.

Se utilizaron 4 fermentadores de 1,55 l de doble flujo continuo (Miniford, Infords, Bottmingen, Switzerland), los fermentadores fueron inoculados con fluido ruminal de vacas fistuladas y de un novillo. Las tasas de pasajes fueron fijas 10 % h⁻¹ para líquidos y de 5 % h⁻¹ para sólidos. La temperatura fue de 39,5 °C, el pH de los fermentadores se dejó fluctuar libremente dentro del rango 5 a 6,8. El control se realizó con el programa IRIS NT (Infords A.G., Bottemingen, Switzerland), al pasar cualquiera de los límites, se infundía automáticamente una solución ácida (HCl 3 N) o base (NaOH 5 N) para mantener el rango establecido. La infusión de saliva artificial (2,5 ml min⁻¹, tabla 13) fue continua dentro de los fermentadores. Contenía 0,4 g l⁻¹ de urea simulando el reciclado de N.

Tabla 12. Composición mineral de la saliva artificial utilizada en los fermentadores de doble flujo continuo que recibieron dos dietas, RCM sub y RCM ens.

Componente	Cantidad
Na ₂ HPO ₄	1,76 g l ⁻¹
NaHCO ₃	5,00 g l ⁻¹
KCl	0,60 g l ⁻¹
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,12 g l ⁻¹
KHCO ₃	1,60 g l ⁻¹
NH ₂ CONH ₂	0,40 g l ⁻¹
Agua destilada	1,00 l

4.1.4. Muestreo del líquido ruminal de los fermentadores de doble flujo continuo.

Los muestreos del líquido de los fermentadores, se realizaron el día dos de mediciones. Los horarios de muestreo fueron de 9, 11, 14, 17 h, se extrajeron 60 ml del líquido del filtro que extrae el flujo filtrado. De cada fermentador, se tomaron dos alícuotas, una para determinar N-NH₃ (se pipetearon 4 ml de licor ruminal y se mezclaron con acidificante 4 ml de ácido clorhídrico 0,2 molar) y la otra para determinar AGV (se pipetearon 9,9 ml de licor ruminal se mezclaron con acidificante (0,1 ml de ácido sulfúrico), todas las muestras se almacenaron a -24°C hasta las determinaciones de N-NH₃ según lo descrito por Chaney, Marbach (1962), las muestras de licor para determinar los AGV se enviaron congeladas y refrigeradas al

laboratorio LASERNU (UBA, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina) donde utilizaron para la determinación lo descrito por Friggens *et al.* (1998).

4.1.5. Registro y mediciones de pH en los fermentadores de doble flujo continuo.

Los valores de pH se registraron en forma continua a través del peachímetro digital fijo que posee cada fermentador. Los datos se almacenaron utilizando el programa IRIS NT (Infords A.G., Bottemingen, Switzerland). Para el análisis estadístico se consideraron, los valores del pH cada diez minutos durante los tres días de mediciones desde la 7 h del primer día.

Para calcular el tiempo debajo de pH menor a 6, se realizó una regresión no lineal con una función logística acumulativa del tiempo en función del pH, con los valores promedio de pH de los días experimentales de cada fermentador por período. Según lo descrito por Alzahal *et al.* (2007). La curva logística depende de tres parámetros que describen β_0 la pendiente, β_2 el límite de tiempo superior, β_1 es el punto de inflexión de la curva.

$$y = \frac{\beta_2}{1 + \exp[-\beta_0 \times (x - \beta_1)]}$$

El eje y representa el tiempo acumulado (min día⁻¹) por cada punto de pH en el eje x. Los valores del eje x representan el pH ruminal. El límite de tiempo superior de la curva logística es de 1440 min día⁻¹, los valores de pH en el eje x comienzan en 4,5 y terminan en 7,5.

4.1.6. Registro de los efluentes y recolección de las muestras, para estimar la digestibilidad aparente de las raciones completamente mezcladas en los fermentadores de doble flujo continuo.

El fermentador de doble flujo continuo presenta un sistema de entrada y dos sistemas de salida. El sistema de entrada es regulado por una bomba que inyecta saliva al fermentador. El primer sistema de salida está formado por el flujo de rebalse que funciona como indica su nombre por rebalse. El segundo sistema de salida es de filtrado el cual se denomina flujo de filtrado, que controla la tasa de pasaje de líquido, y se regula por una bomba que extrae el líquido ruminal del fermentador. El flujo de rebalse se regula entre los dos sistemas, él de saliva que inyecta una cantidad

establecida de saliva por minuto y el sistema de flujo filtrado que extrae líquido ruminal por minuto, a una menor tasa de extracción que la entrada de la saliva. Esta diferencia de flujos de entrada y salida regulan el flujo de rebalse.

En los días experimentales, se controlaron los pesos de los efluentes de flujos filtrados y flujos de rebalse de cada fermentador. Estos se mantuvieron a 4°C y se recolectaron cada 24 h antes de la primera alimentación del día siguiente y se almacenaron en un freezer a -24°C.

Terminados los periodos del ensayo se descongelaron los flujos de rebalse, de los cuales se determina la digestibilidad aparente, y se tomó una alícuota por día experimental de cada fermentador. Estas alícuotas se congelaron a -24°C y posteriormente se liofilizaron. La materia seca de los flujos de rebalse, se estimó con el peso de la muestra puesta a liofilizar como valor inicial menos el peso final después de la liofilización (Liofilizador L-A-B4, RIFICOR, C.P., Argentina.) dividido por el peso inicial por cien, posteriormente se seco por estufa a 60 °C durante 48 h. Esto se realizó para asegurarse que el peso final fuera en 100 % MS. Con las muestras seca, se realizó un pool por fermentador dentro del periodo.

Estas muestras liofilizadas se enviaron al Laboratorio de Nutrición de EEA Balcarce (INTA, Balcarce, Argentina), para que se realizaran las siguientes determinaciones.

Materia orgánica (MO), por calcinación en mufla a 550-600 °C durante 4 horas.

Proteína bruta (PB) por combustión de la muestra en oxígeno ultra puro utilizando un analizador LECO FP 528 (Horneck; Miller, 1998).

Fibra en detergente neutro (FDN) con equipo ANKOM 200 (ANKOM Corp., Macedon, NY), según Komarek *et al.* (1994).

Fibra en detergente ácido (FDA) con equipo ANKOM 200 (ANKOM Corp., Macedon, NY), según Komarek *et al.* (1993).

4.1.7. Estimación de la digestibilidad aparente y tasas de digestión de las raciones completamente mezcladas en los fermentadores de doble flujo continuo.

Una vez determinadas la composición química de los efluentes de rebalse de los fermentadores. El valor de cada determinación química se aplicó a los efluentes de rebalse en gramos de materia seca para los tres días de experimentación y estos valores se utilizaron para estimar la digestibilidad aparente de las distintas fracciones químicas de las RCM.

La digestibilidad aparente de la materia seca se determinó con la ecuación [a] y la digestibilidad aparente de la materia orgánica, proteína bruta, fibra en detergente neutro y fibra en detergente ácido se determinaron con la ecuación [b].

$$\text{Digestibilidad aparente de MS} = \frac{[(\text{g MS alimento día}^{-1} - (\text{g efluente MS día}^{-1} - \text{g saliva MS día}^{-1a})) / \text{g Ms alimento}] \times 100}{[a]}$$

^a g saliva artificial, se usó el valor 9,48 g l⁻¹ que sugiere Stern, Hoover (the dual flow continuous culture system) para el efluente de rebalse l día⁻¹

$$\text{Digestibilidad aparente MO} = \frac{[(\text{g MO alimento} - \text{g MO efluente}) / \text{g MO alimento}] \times 100}{[b]}$$

Para determinar las tasas de digestión se empleó la siguiente fórmula.

$$\text{Kd}^{\circ} = \left(\frac{\text{digestibilidad aparente}}{\text{Tiempo de retención de sólidos, h}} \right) \times 100$$

^o La tasa de digestión se estimó para MS, MO, PB, FDN, FDA.

4.1.8. Estimación de las tasas de flujo de los fermentadores de doble flujo continuo.

Los flujos de rebalse y filtrado se estimaron a través de la tasa de dilución de los fermentadores. Las ecuaciones utilizadas se describen a continuación.

Tasa dilución = porcentaje de volumen de fermentador reemplazado por hora.

$$\text{Tasa de dilución de líquidos (TDL)} = 10 \% \text{ h}^{-1} = 0,10 \text{ h}^{-1}$$

$$\text{Tasa de dilución de sólidos (TDS)} = 5 \% \text{ h}^{-1} = 0,05 \text{ h}^{-1}$$

Tiempo de retención de sólidos = recíproco (1/TDS) se pre planificó a 20 h.

Volumen de fermentador = 1550 ml

$$\text{TDL \%} = \frac{[(\text{Volumen del flujo filtrado (ml h}^{-1}) + \text{Volumen del flujo de rebalse (ml h}^{-1})] / \text{Volumen del fermentador (ml)}}{100}$$

$$\text{TDS \%} = \frac{[\text{Volumen del flujo de rebalse (ml h}^{-1})] / \text{Volumen del fermentador (ml)}}{100}$$

4.1.9. Análisis estadístico.

Los valores de pH, la concentración de AGV y N-NH₃ en líquido de los fermentadores de doble flujo continuo, se analizaron como medidas repetidas en el tiempo por PROC MIXED de SAS utilizando el modelo:

$$Y_{ijkl} = \mu + \tau_i + \delta_{ij} + t_k + \beta_l + (\tau \times t)_{ik} + \varepsilon_{ijkl}$$

Donde: Y_{ijkl} = variable dependiente, μ = media general, τ_i = efecto tratamiento, δ_{ij} = el efecto aleatorio del fermentador j dentro del tratamiento i , t_k = efecto hora k , β_l = efecto periodo l , $(\tau \times t)_{ik}$ = efecto interacción tratamiento \times hora ij , ε_{ijkl} = error residual asociado a la $ijkl$ observación.

El término del error fue evaluado con varias matrices de varianzas y covarianzas, seleccionando la matriz que presentara menor BIC en cada variable (SAS, 2009).

Los minutos por debajo de pH 6, la digestibilidad aparente y las tasas de digestión de MS, MO, FDN, FDA y PB, las tasas de dilución de sólidos y líquidos, tiempos de retención de sólidos, la energía metabolizable y la energía neta de lactancia de las RCM sub y RCM ens en los fermentadores de doble flujo continuo, se analizaron con PROC GLM de SAS utilizando el siguiente modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + F_j + P_k + \varepsilon_{ijk}$$

Donde: Y_{ijk} = variable dependiente, μ = media general, T_i = efecto tratamiento, F_j = efecto fermentador j , P_k = efecto periodo k , ε_{ijk} = error residual asociado a la ijk observación.

Las diferencias fueron consideradas significativas con un $P < 0,05$. Todos los resultados están expresados como medias de cuadrados mínimos, se ajustaron por comparaciones múltiples Tukey-Kramer y se informa el error estándar de la media (EEM).

4.2. Resultados.

4.2.1. Composición química de las raciones completamente mezcladas y volúmenes sólidos de los fermentadores de doble flujo continuo.

Los resultados de composición química de las RCM utilizadas en los fermentadores de doble flujo se muestran en la tabla 13. Las RCM se elaboraron en base seca, con los alimentos secos y molidos.

Tabla 13. Características (promedio \pm desvío estándar) de dos raciones completamente mezcladas evaluadas en fermentadores de doble flujo continuo, base materia seca.

	Tratamientos	
	RCM sub ^a	RCM ens ^b
% MO ^c	93,70 \pm 1,57	92,50 \pm 0,36
% PB ^d	17,05 \pm 0,55	16,52 \pm 1,05
% FDN ^e	39,17 \pm 0,45	39,97 \pm 1,43
% FDA ^f	15,33 \pm 0,06	17,97 \pm 0,87

a, Ración completamente mezclada subproductos. b, Ración completamente mezclada ensilaje. c, % Materia orgánica. d, % Proteína bruta. e, % Fibra en detergente neutro. f, % Fibra en detergente ácido.

En la tabla 14 se muestran los resultados de laboratorio, para las determinaciones químicas de los efluentes de rebalse de los fermentadores de doble flujo continuo que recibieron las RCM.

Tabla 14. Composición química de los efluentes de rebalse (promedio \pm desvío estándar) de los fermentadores de doble flujo continuo que recibieron dos dietas RCM sub y RCM ens, en base materia seca.

	Tratamientos	
	RCM sub ^a	RCM ens ^b
% MS ^c	5,07 \pm 0,13	5,07 \pm 0,09
% MO ^d	79,00 \pm 0,85	78,15 \pm 1,65
% PB ^e	16,70 \pm 1,04	16,15 \pm 0,44
% FDN ^f	41,28 \pm 1,82	40,53 \pm 1,58
% FDA ^g	15,75 \pm 1,28	17,25 \pm 0,66

a, Ración completamente mezclada subproductos. b, Ración completamente mezclada ensilaje. c, % de Materia seca de los efluentes de rebalse. d, % Materia orgánica. e, % Proteína bruta. f, % Fibra en detergente neutro. g, % Fibra en detergente ácido.

La composición química de los efluentes de rebalse de las RCM sub y RCM ens presentaron similares características. Los porcentajes de MO, PB, FDN y FDA están expresados tal cual se ingresaron al laboratorio. Los efluentes de rebalse contienen una cantidad apreciable de sales provenientes de la saliva artificial, las cuales diluyen el verdadero contenido de los componentes. Para dimensionar el efecto de las sales de la saliva, se descontaron las sales provenientes de la saliva en la muestra entrada al laboratorio. Los porcentajes corregidos resultaron ser de: % MO (91,35; 92,49), % PB (19,31; 19,11), % FDN (47,72; 47,96), % FDA (18,21; 20,42) para RCM sub y RCM ens, respectivamente. Estos porcentajes son únicamente informativos, ya que carecen de utilidad en los cálculos de las digestibilidades aparentes de las RCM.

4.2.2. Ambiente ruminal *in vitro* de los fermentadores de doble flujo continuo.

En la siguiente tabla 15 se describe el ambiente ruminal de los fermentadores de doble flujo continuo al ser suministrada las RCM sub y RCM ens.

Tabla 15. Efecto de dos dietas RCM sub y RCM ens, sobre el pH, las concentraciones de nitrógeno amoniacal y ácidos grasos volátiles del líquido de los fermentadores de doble flujo continuo.

	Tratamientos			Valor P				
	RCM sub ^a	RCM ens ^b	EEM ^c	T ^d	P ^e	F ^f	H ^g	T*H ^h
pH	6,27	6,21	0,004	0,78	0,90		>0,01	>0,01
Minutos < pH 6, min día ⁻¹	150	230	84,92	0,70	0,49	0,97		
N-NH ₃ , mg dl ⁻¹	8,90	7,80	0,31	0,29	0,18		>0,01	>0,01
Total AGV, mmol l ⁻¹	84,93	86,18	3,34	0,87	0,02		0,01	0,72
Acético:propiónico	2,29	2,58	0,07	0,28	0,07		0,18	0,04
Acético, mmol l ⁻¹	48,00	51,43	1,73	0,46	0,05		0,07	0,55
Propiónico, mmol l ⁻¹	21,43	20,87	1,07	0,85	0,04		>0,01	0,65
Butírico, mmol l ⁻¹	12,87	11,50	0,82	0,57	0,06		>0,01	0,72

Nivel de significancia del 5 %. Valores expresados como medias de cuadrados mínimos. a, Ración completamente mezclada subproductos. b, Ración completamente mezclada ensilaje. c, Error estándar de la media. d, Tratamientos. e, Período. f, Fermentador. g, hora. h, Interacción tratamiento por hora.

El pH y minutos < pH 6 dentro de los fermentadores con las RCM no presentaron diferencias para el efecto principal tratamiento. Sin embargo, para el pH se encontró diferencias para la interacción tratamiento por hora. En la interacción tratamiento por hora se observó el siguiente patrón: dos horas antes de la alimentación y en la hora de alimentación (7 y 19 h) no presentaron diferencias entre tratamientos. En la primera hora (8 y 20 h) post alimentación presentó diferencias, siendo el pH de RCM ens inferior a RCM sub. A continuación en la siguiente hora (9 y 21 h) se igualan los pH y no presentan diferencias. En las siguientes siete horas (10 a 16 h y 22 a 4 h) posteriores el pH de RCM sub es superior a RCM ens presentó diferencias, este patrón se observó tanto para las horas de día como las de noche.

La concentración de nitrógeno amoniacal, al igual que el pH, no presentó diferencias entre tratamientos. Pero sí el efecto interacción tratamiento por hora. La hora 14 presentó diferencias RCM sub 9,15 mg dl⁻¹ vs RCM ens 6,58 mg dl⁻¹ (p 0,01).

En todos los AGV el efecto principal tratamiento no presentó diferencias. En general las concentraciones de totales de AGV fueron mayores en el primer periodo (p < 0,05) que en el segundo periodo (97,34 vs 73,68 mM l⁻¹), al igual que el ácido propiónico (24,96 vs 17,35 mM l⁻¹). La relación acético propiónico en la interacción

tratamiento por hora presentaron diferencias, la RCM ens presentó mayor relación en todos los horarios que la RCM sub.

4.2.3. Digestibilidad aparente de las raciones completamente mezcladas en fermentadores de doble flujo continuo.

En el tabla 16 se presentan los resultados de la digestibilidad aparente de las RCM en fermentadores de doble flujo continuo a los que se les suministró las RCM sub y RCM ens.

Tabla 16. Efectos de dos dietas RCM sub y RCM ens, sobre la digestibilidad de las distintas fracciones químicas de las RCM y las tasas de dilución de líquidos y sólidos, en fermentadores de doble flujo continuo.

	Tratamiento			Valor p		
	RCM sub ^a	RCM ens ^b	EEM ^c	T ^d	F ^e	P ^f
Digestibilidad aparente						
Materia seca, %	55,06	56,82	0,69	0,47	0,98	0,68
Materia orgánica, %	46,11	48,27	0,79	0,30	0,74	0,29
Proteína bruta, %	36,33	33,27	1,70	0,45	0,43	0,43
Fibra en detergente neutro, %	33,44	36,50	1,73	0,64	0,97	0,6
Fibra en detergente ácido, %	39,48	35,64	2,72	0,58	0,50	0,93
Tasa de digestión						
Materia seca por hora, %	2,54	2,62	0,06	0,47	0,60	0,98
Materia orgánica por hora, %	2,13	2,23	0,05	0,30	0,29	0,74
Proteína bruta por hora, %	1,67	1,53	0,10	0,45	0,43	0,43
Fibra en detergente neutro por hora, %	1,54	1,68	0,18	0,64	0,67	0,94
Fibra en detergente ácido por hora, %	1,82	1,64	0,19	0,58	0,93	0,50
Tasa de pasaje						
Tasa de dilución de líquidos, % h ⁻¹	9,59	9,55	0,02	0,51	0,54	0,42
Tasa de dilución de sólidos, % h ⁻¹	4,66	4,69	0,06	0,92	0,17	0,01
Tiempo de retención de sólidos, h	21,42	21,46	0,30	0,87	0,21	0,02
Concentración energética						
Energía metabolizable, Mcal KgMS ⁻¹	1,96	2,05	0,02	0,34	0,98	0,60
Energía Neta lactancia, Mcal KgMS ⁻¹	1,33	1,25	0,02	0,26	0,98	0,60

Nivel de significancia 5 %. Valores expresados como medias de cuadrados mínimos. a, Ración completamente mezclada subproductos. b, Ración completamente mezclada ensilaje. c, Error estándar de la media. d, Tratamiento. e, Fermentador. f, Período.

La digestibilidad aparente y las tasas de digestión de la MS, MO, PB, FDN y FDA no presentaron diferencias entre tratamientos. Las tasas de dilución de sólidos y líquidos, no presentaron diferencias entre tratamientos. Hubo diferencias, para la tasa de dilución de sólidos ($4,51 \% h^{-1}$; $4,81\% h^{-1}$) y el tiempo de retención de sólidos (22,14 h; 20,75 h), en el periodo uno y dos respectivamente.

4.2.4. Comparación entre fermentadores de doble flujo continuo y Daisy para estimar el balance energético y proteico según el NRC (2001).

La estimación de total de nutrientes digestibles y energía de las RCM se muestra en la Tabla 17, donde se observan los resultados de los ensayos I (Daisy) y III (fermentadores).

Tabla 17. Efectos de dos dietas RCM sub y RCM ens, sobre la digestibilidad aparente de la materia seca, energía bruta, digestible, metabolizable y neta de lactancia obtenidas por Daisy o Fermentadores.

	DAISY		FDFC ^a	
	RCM sub ^b	RCM ens ^c	RCM sub	RCM ens
Digestibilidad aparente de MS, % MS	66,14	67,33	55,06	56,82
Energía Bruta, Mcal KgMS ⁻¹	4,35	4,41	4,35	4,41
Energía Digestible, Mcal KgMS ⁻¹	2,88	2,97	2,39	2,50
Energía Metabolizable, Mcal KgMS ⁻¹	2,36	2,43	1,96	2,05
Energía Neta de lactancia, Mcal KgMS ⁻¹	1,47	1,51	1,22	1,27

a, Fermentador de doble flujo continuo. b, Ración completamente mezclada subproductos. c, Ración completamente mezclada ensilaje.

Los resultados obtenidos sobre la digestibilidad aparente de la materia seca para los ensayos difieren debido al tiempo de incubación de las RCM. En el ensayo I fue de 48 h, mientras para el ensayo III en los fermentadores fue de 20 h, representando tasas de pasajes de de 2,08 y 5 %, respectivamente. En términos porcentuales la disminución de la DaMS de RCM sub fue del 20% y para RCM ens del 18% comparado los resultados de ensayo III con el de las ensayo I.

En la tabla 18, se muestran los resultados del balance energético y proteico de las vacas que consumieron las RCM sub y RCM ens, comparando los resultados de los fermentadores de doble flujo continuo con el Daisy.

Tabla 18. Efecto de dos dietas RCM sub y RCM ens, sobre el balance energético y proteico de las vacas según Nutrient Requirements of Dairy Cattle, NRC (2001) comparando las digestibilidades aparentes de Daisy y Fermentadores.

	DAISY		FDFC ^a	
	RCM sub ^b	RCM ens ^c	RCM sub	RCM ens
Peso vivo promedio de las vacas, Kg	572,81	598,72	572,81	598,72
Producción de leche, l día ⁻¹	25,96	24,88	25,96	24,88
Consumo de MS, KgMS día ⁻¹	24,82	24,15	24,82	24,15
Aportes dieta ENI, Mcal día ⁻¹	41,27	37,95	32,97	30,72
Requerimientos totales ENI, Mcal día ⁻¹	32,92	32,46	32,92	32,46
Balance de Energía Neta lactancia, Mcal día ⁻¹	8,59	8,41	0,28	1,18
Exceso de energía (%)	21%	22%	1%	4%
Alimento Proteína Bruta, % MS	17,1	16,5	17,10	16,50
Aporte dietario PB, g día ⁻¹	4244,22	3984,75	4244,22	3984,75
Proteína metabolizable suministrada, g día ⁻¹ *	3216,45	2585,99	3408,08	3382,88
Proteína metabolizable requerida, g día ⁻¹ *	2412,52	2187,97	2439,08	2211,99
Balance proteína metabolizable, g día ⁻¹	803,93	398,02	968,99	1170,89
PDR suministrada, g día ⁻¹	2047,10	2562,07	1541,93	1325,73
PDR requerida, g día ⁻¹	2466,16	2451,93	2075,52	2098,65
Balance PDR, g día ⁻¹	-419,06	110,14	-533,59	-772,92
PNDR suministrada, g día ⁻¹	2197,12	1422,68	2702,29	2659,02
PNDR requerida, g día ⁻¹	1192,21	925,16	1491,05	1195,42
Balance de PNDR, g día ⁻¹	1004,91	497,52	1211,24	1463,60

a, Fermentador de doble flujo continuo. b, Ración completamente mezclada subproductos. c, Ración completamente mezclada ensilaje. Valores estimados según Nutrient Requirements of Dairy Cattle, NRC (2001).

Al comparar el balance energético a partir de las diferencias de digestibilidad obtenidas por Daisy y FDFC se observa que el consumo de energía fue mayor a lo requerido para ambos tratamientos y comparaciones.

Si se utiliza la digestibilidad aparente de la materia seca en 48 h por Daisy, se observa que se consumió en ENI un promedio de 21,5 % más en los tratamientos, que los requerimientos de las vacas.

En cambio, al utilizar la digestibilidad de 20 h por fermentadores, el porcentaje por encima de los requerimientos fue de un 2,5 % acercándose más al balance energético de 0 %.

En cuanto al balance de proteína metabólica fue superior a los requerimientos, pero al comparar el balance de PDR se observa que la RCM sub en el ensayo I fue un 17 % menor a lo requerido. En cambio en el ensayo III la PDR fue un 31 % menor para ambos tratamientos.

Sin embargo, el aporte dietario de proteína es superior a los requerimientos en ambas comparaciones en promedio 17 % y 20 % para ensayo I y ensayo III, respectivamente.

5. DISCUSIÓN.

Los ensayos realizados en la presente tesis, engloban métodos de evaluación *in vivo* e *in vitro* aplicables en la nutrición de vacas lecheras.

La primera parte de la discusión está referida a los ensayos *in vivo* (ensayo I y II), la segunda parte al ensayo *in vitro* (ensayo III) y una tercera parte sobre los puntos en común entre ambos.

En la primera parte de la tesis, se realizaron evaluaciones de ambiente ruminal de las RCM y la cinética de degradación de la FDN. Los resultados pudieron ser comparados con los obtenidos en el ensayo *in vitro* de los fermentadores de doble flujo continuo en condiciones controladas.

5.1. Primera parte: ensayos *in vivo*.

Los modelos matemáticos utilizados en nutrición animal provienen de datos obtenidos en ensayos *in vivo* e *in vitro*. Una vez que el efecto es cuantificado, se incorporan a estos modelos que predicen las variables respuestas de interés. El principal inconveniente que presentan los modelos matemáticos, es que los coeficientes utilizados provienen de efectos conocidos en un momento y lugar determinado.

El modelo NRC (2001), propone diversas ecuaciones matemáticas para modelar las respuestas metabólicas y productivas de vacas lecheras. La problemática de este modelo es la cantidad de información necesaria para hacerlo funcionar.

Los primeros dos capítulos del NRC (2001) están referidos al consumo y al valor energético de los alimentos.

En todos los ensayos se utilizó RCM sub y RCM ens, y al momento de la elaboración de las RCM se consideraron los requerimientos de las vacas de 600 kg de peso vivo, 180 días de lactancia, 25 litros de producción y 3,4 % de grasa de la leche.

La composición de las RCM debería haber aportado una concentración energética de 2,6 Mcal EM KgMS⁻¹, proteína: 16 % KgMS⁻¹, 37 % de FDN. En la formulación de las RCM se consideró la composición química individual de los alimentos.

Una vez elaboradas las RCM se evaluó la composición química de cada RCM en el laboratorio (Tabla 2). La digestibilidad de la MS teórica de las RCM fue de 72 %. En relación a las RCM sub y RCM ens presentaron una digestibilidad de la MS de 66,14 y 67,33 la pérdida de energía fue de 0,22 y 0,16 Mcal EM KgMS⁻¹, respectivamente.

Es muy probable que la mezcla de alimentos haya afectado la digestibilidad de la materia seca de las RCM, por características intrínsecas de los mismos.

La menor concentración energética obtenida en las RCM indica que el consumo de materia seca debería aumentar para poder cubrir los requerimientos de una producción constante.

El consumo de materia seca fue superior para ambos tratamientos en comparación a lo estimado según el NRC (2001) (Tabla 5), al evaluar la producción de leche grasa corregida como variable independiente y el consumo de materia seca como variable dependiente, (Figura 2).

En líneas generales el modelo propuesto por el NRC (2001), donde se considera la semana de lactancia, la producción de leche grasa corregida y el peso de la vaca, subestimó el consumo observado en ensayos (Halachmi *et al.* 2004; Ellis *et al.*, 2006). Además, el modelo se ajusta mejor a las primeras semanas de la lactancia, que para las últimas semanas de la lactancia.

Se realizó una regresión lineal, donde se compara las ordenadas al origen y las pendientes de los consumos de materia seca del ensayo en función de la producción de leche grasa corregida (dado que no se cuenta con el dato del ensayo se estimó en 3,4% grasa para poder estimar LGC), con lo predicho por el modelo NRC.

Las ordenadas al origen (22,65; 23,53), las pendientes (0,092; 0,027), para RCM sub y RCM ens no presentaron diferencias ($P > 0,05$), si al compararlas con la ordenada de origen (11,21) y la pendiente (0,38) del modelo NRC presentaron diferencias ($P < 0,05$).

Las pendientes fueron positivas para todos los casos, sin embargo para RCM ens fue la más cercana a cero. Los R^2 fueron NRC (0,85), RCM sub (0,032) y RCM ens (0,008).

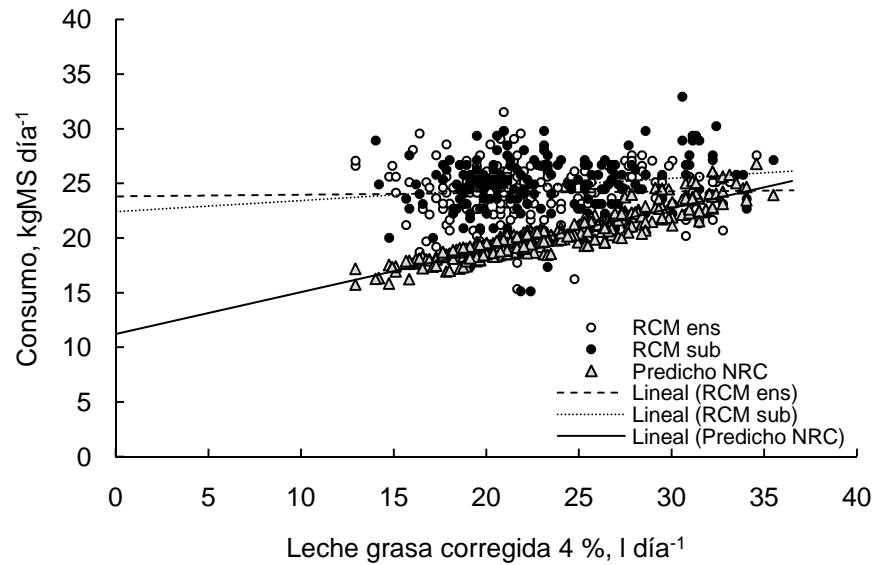


Figura 2. Relación entre la producción de leche grasa corregida al 4% y el consumo de materia seca observado para RCM sub, RCM ens y el predicho por el NRC.

La ecuación del consumo de materia seca del NRC (2001), establece que a medida que aumenta la producción de leche corregida 4% aumenta el consumo de materia seca.

En este ensayo los consumos observados para RCM sub y RCM ens también produjeron la misma tendencia positiva en el aumento de la producción de leche, pero con menor magnitud y precisión.

La comparación de los valores observados de consumo de materia seca en el ensayo vs los calculados según el modelo del NRC, se presentan en la figura 3.

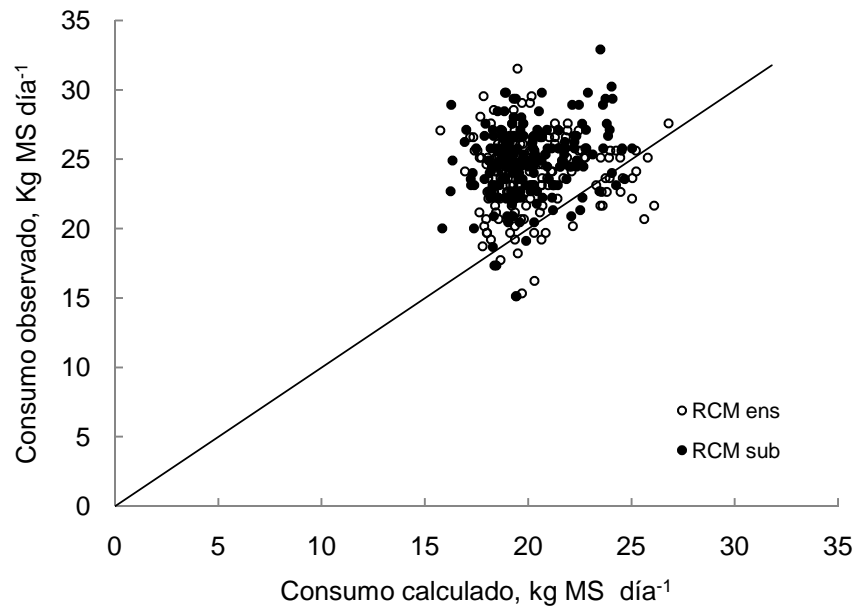


Figura 3. Comparación de los consumos observados en función de los consumos calculados en base al NRC en vacas lecheras que recibieron RCM sub y RCM ens. La línea continua representa $y=x$, los puntos redondos, el consumo observado para cada tratamiento.

El NRC (2001) al evaluar la fórmula del consumo utilizando datos de ensayos publicados, encontró que la media del consumo de materia seca de los observados era de $22,3 \text{ kg día}^{-1}$ y el de los estimados de $22,1 \text{ kg día}^{-1}$, siendo el valor cuadrático medio fue de 2 kg día^{-1} .

El NRC (2001) cuando evalúa la dispersión de los valores estimados de consumo, el 41 % de los consumos esperados estaban dentro del ± 5 por ciento del consumo observado y el 71 % de los consumos esperados dentro ± 10 por ciento del consumo observado.

Al realizar el mismo análisis con los resultados del ensayo, se observó que el consumo medio para RCM sub y RCM ens fue de $24,82$ y $24,15 \text{ kg día}^{-1}$, y los estimados por el NRC para RCM sub y RCM ens fueron de $20,12$ y $20,10 \text{ kg día}^{-1}$. El valor cuadrático medio para RCM sub y RCM ens fue de $2,57$ y $2,50 \text{ kg día}^{-1}$. En cuanto a la dispersión de los valores estimados de consumo para RCM sub y RCM ens, el 53 % y 58% se encontraron dentro ± 5 por ciento de los consumos observados y el 97 % de los consumo estimados estuvieron dentro ± 10 por ciento del consumo observado para RCM sub y RCM ens, respectivamente.

En términos generales, al utilizar la formula de consumo del NRC (2001) ésta subestima el consumo de materia seca con respecto a lo observado en el ensayo I.

El consumo de ENL para ambos tratamientos fue superior en comparación, a la ENL requerida por las vacas. (Figura 4).

Al calcular los requerimientos en base a lo descrito por el NRC (2001) y estimar el balance de energía podemos observar que en términos generales (Tabla 6) si se utiliza la concentración energética de las RCM obtenidas en laboratorio, el exceso de energía consumida fue de 21 y 22 % mayor para RCM sub y RCM ens, respectivamente.

Sin embargo, el 20 % de los valores de energía consumida estuvo en un ± 5 % de lo requerido por las vacas y el 53 % de la energía consumida estuvo en un ± 10 % de lo requerido por las vacas para RCM sub y RCM ens, según el NRC (2001).

Cuando el NRC (2001) evalúa la predicción del consumo de ENI y la ENI requerida, encuentra que están altamente correlacionadas ($r^2= 0,61$; $p<0,01$), el 46 % de la energía consumida estuvo en un ± 5 % de lo requerido por las vacas y el 76 % de la energía consumida estuvo en un ± 10 % de lo requerido por las vacas.

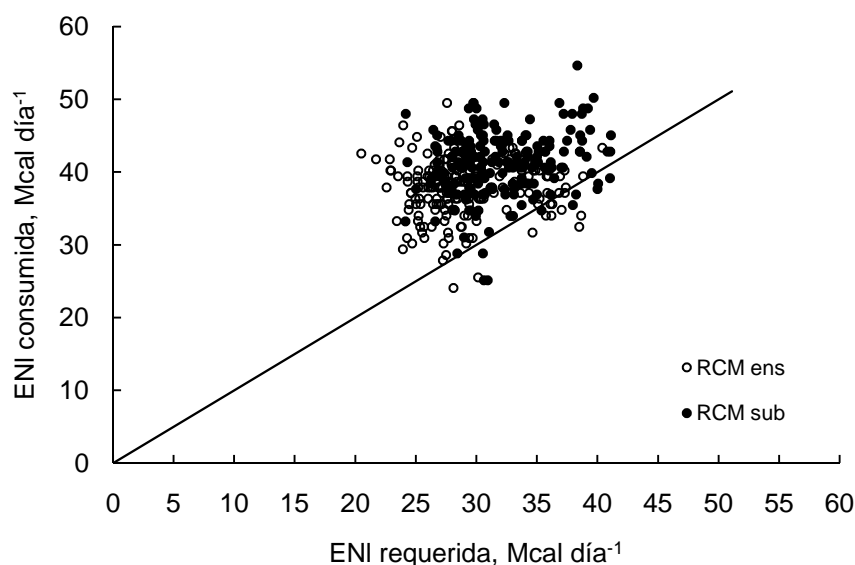


Figura 4. Consumo de energía neta de lactancia de las vacas en comparación con la energía neta de lactancia requerida para los tratamientos RCM sub y RCM ens. La línea continua $y=x$, los puntos redondos el consumo de ENL Mcal día^{-1} .

Para que el balance energético sea 0 %, con el consumo de materia seca observado, las DIVMS de las RCM deberían ser del 53,94 y 54,42 % para RCM sub y RCM ens, obteniendo una ENI de 1,29 y 1,20 Mcal KgMS (Figura 5).

Si se asume que la DIVMS es lineal en relación con el tiempo de incubación, la tasa estimada de digestión en laboratorio para RCM sub sería de $1,37 \text{ \% h}^{-1}$ y para RCM ens $1,40 \text{ \% h}^{-1}$. Al estimar el tiempo necesario para lograr esas DIVMS

estimadas, las horas de retención ruminal necesarias, según las tasas de digestión antes mencionadas serían de 39,37 RCM sub y 38,87 h RCM ens valores similares a los observados en el tiempo de retención ruminal (Tabla 11).

El 73 % de los valores de consumo de energía estarían ± 5 ENI del balance energético 0 y el 96 % de los valores de consumo de energía en ± 10 ENI del balance energético 0, para RCM sub y RCM ens.

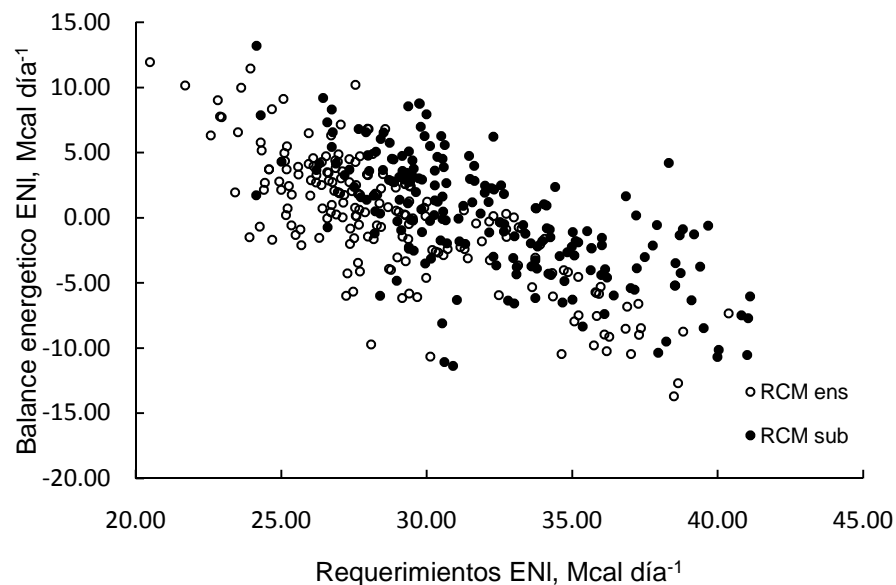


Figura 5. Relación entre los requerimientos energéticos y el balance energético 0 % de ENI para RCM sub y RCM ens. Los consumos observados y la ENI por Mcal KgMS corregida asumiendo que la DIVMS fue de 53,94 % RCM sub y 54,42 % RCM ens.

Al comparar los resultados de la digestibilidad aparente de la materia seca de los ensayos I y III (Tabla 17), se puede observar que los resultados de digestibilidad de la materia seca en los fermentadores para RCM sub y RCM ens (55,06 y 56,82 %) se acercan al valor de digestibilidad para un balance energético 0 % para el consumo observado (53,94 y 54,42 %).

El consumo de MS y de FDN para RCM sub y RCM ens como % de peso vivo fue de 4,35 % y 4,06 % y de 1,62 % y 1,70 %, respectivamente. Ambas variables fueron elevadas en ambas raciones, en relación a lo citado por Mertens (1995) que encontró que la máxima respuesta productiva de LGC con 3,8 % y 1,2 % de consumo de MS y FDN, respectivamente.

Zebeli *et al.*, (2008) describe que en una dieta con 49 % de FDN, se observó un consumo de materia seca del 3,18 % del peso vivo y 1,6 % de consumo de FDN del peso vivo, con una tasa de pasaje del retículo rumen de 8,4 % h⁻¹.

El elevado consumo de materia seca en el ensayo I, puede haber limitado la respuesta productiva de ambas RCM, debido a una mayor tasa de pasaje y una disminución en la digestibilidad de la materia seca, si se considera lo citado por Mertens (1995).

En cuanto al balance proteico de las RCM, fue positivo para ambos tratamientos (Tabla 7). La cantidad de PDR suministrada fue inferior para RCM sub y superior para RCM ens, la PNDR suministrada fue superior en ambos tratamientos con mayor magnitud para RCM sub.

Cuando se comparan los resultados obtenidos en el ensayo III, para la PDR suministrada se observó que el balance de PDR es negativo para ambos tratamientos y el balance de PNDR suministrada es positivo, y que el balance de proteína metabólica es positivo para ambos tratamientos.

El NRC (2001) al evaluar el rendimiento animal según la PB, PDR y PNDR propone tres ecuaciones.

La primera¹ toma en cuenta la PB de la dieta como fijo y el consumo observado para estimar el rendimiento de leche, aplicando estas ecuaciones y los consumos de MS de los tratamientos y la concentración de PB se obtiene que el rendimiento de leche debería haber sido de 34,76 y 33,81 l día⁻¹ para RCM sub y RCM ens. Esta ecuación propuesta tiene un r² de 0,29 por lo que su valor de predicción es bajo.

La segunda² y tercera³ ecuación propone utilizar la PDR y la PNDR para estimar la producción de leche y la cantidad de proteína en leche. Ambas ecuaciones poseen un R² de 0,52 y 0,51. La producción de leche y la concentración de proteína para RCM sub y RCM ens, estimados con los valores de PDR y PNDR teóricos del ensayo I, fueron de 37,20 y 35,80 l día⁻¹ y de 6,95 y 6,97 %, respectivamente.

Los resultados del ensayo I no son coincidentes con los resultados del NRC (2001), además de elevar el porcentaje de proteína por encima de valores normales.

Similares resultados se obtienen si se utiliza los valores de PDR y PNDR del ensayo III con estas dos ecuaciones la producción de leche (33,79 y 29,50 l día⁻¹) y la concentración de proteína (5,93 y 3,86 %) para RCM sub y RCM ens, respectivamente.

¹ Rendimiento de leche = $0,8 \times CMS + 2,3 \times PB - 0,05 \times PB^2 - 9,8$ ($r^2 = 0,29$)

² Rendimiento de leche = $-55,61 + 1,15 \times CMS + 8,79 \times PDR - 0,36 \times PDR^2 + 1,85 \times PNDR$ ($r^2 = 0,52$)

³ Proteína de la leche = $-1,57 + 0,0275 \times CMS + 0,223 \times PDR - 0,0091 \times PDR^2 + 0,041 \times PNDR$ ($r^2 = 0,51$)

El principal problema que contienen las fórmulas es la sobreestimación, ya que éstas linealizan las respuestas productivas a mayor consumo, mayor producción de leche y proteína.

A modo demostrativo y para indagar cuáles deberían ser los aportes de PDR y PNDR de las RCM, para obtener la producción observada en el ensayo, se realizó el procedimiento inverso.

Se calcularon los valores que mejor ajustan a lo observado en producción de leche y proteína para RCM sub con una concentración de PB 17,1 % la partición de la proteína sería de PDR 21 % y PNDR 79 %; para RCM ens con una concentración de PB 16,5 %, la partición sería de PDR 24 % y PNDR 76 %.

Es contundente que estos valores son menores a las RCM (Tabla II), sin embargo estos resultados están más cercanos a los del ensayo III.

En un estudio realizado por Flis; Wattiaux (2005) donde compararon distintos consumos de PDR y PNDR, encontraron que el CMS aumenta cuando la PNDR está en exceso en la ración y la magnitud del aumento fue de 2,1 KgMS día⁻¹.

Además, que el consumo de nitrógeno fue mayor en el tratamiento con exceso de PNDR al compararlo con el tratamiento con PNDR normal.

En el balance de N encontraron que el N de la materia fecal y el N de la orina de ambos tratamientos no presentaron diferencias. El N de la leche fue mayor en el tratamiento con PNDR normal, pero al observar la retención total de N, fue mayor para el tratamiento PNDR en exceso.

En otro estudio, Kalscheur *et al.*, 2006 comparó dietas con incrementos en la PDR manteniendo constante la PNDR, si bien el estudio no fue diseñado para encontrar el valor óptimo de PDR, evidencian que el valor máximo debería ser de 9,5 % de PDR.

A partir de este valor no encuentran diferencias para la producción de leche y proteína láctea, no obstante, el aumento de PDR de 6,8 a 11% en la dieta mejoró en forma lineal todas las respuestas productivas y el CMS se mantuvo constante.

Además, concluyen que el aporte de PDR por debajo a lo requerido según el NRC (2001) disminuye la producción de leche, de grasa y proteína, indicando que un bajo aporte de PDR es inadecuado para la síntesis de proteína microbiana en el rumen.

Se infiere que el mayor CMS en RCM sub y RCM ens podría deberse a un mayor consumo de PNDR y se podría haber esperado una mayor respuesta productiva de la RCM sub si el balance de PDR hubiese sido positivo.

En cuanto a la medición de nitrógeno ureico en sangre para el tratamiento RCM sub fue superior al de RCM ens.

Varios autores encontraron una relación entre la PDR y nitrógeno ureico en sangre en donde a medida que la PDR aumenta en las dietas, el nitrógeno ureico en sangre aumenta (Kalscheur *et al.*, 2006; Brito; Broderick, 2006; Gressley; Armentano, 2007).

En un estudio Gustafsson; Palmquist (1993) observaron que el pico de nitrógeno ureico en sangre se produce 1 a 2 h después del pico de amoníaco en el rumen, indicativo de la degradación de las proteínas, aminoácidos y urea por parte de los microorganismos ruminales.

En el ensayo las muestras de sangre fueron tomadas posterior al ordeño y el pico de amoníaco se presentó alrededor de las 11 horas.

El amoníaco y el amonio son absorbidos en el rumen, lumen intestinal y transportado como amonio por el sistema venoso portal al hígado a donde es transformado en urea y glutamina a partir de glutamato.

De la urea producida por el hígado, una parte se excreta en la orina y el resto se recicla de nuevo al rumen e intestino, a través de transferencia directa de la sangre a través del tejido epitelial o por medio de la saliva (Reynolds; Kristensen, 2008).

En el ensayo II los parámetros de ambiente ruminal no presentaron diferencias entre tratamientos.

El pH ruminal de las vacas para el tratamiento RCM sub fue de 5,97 y para RCM ens 6,20.

En relación a los valores ruminales de pH bajos que pueden tener efectos directos sobre la degradación de la fibra, la digestibilidad de la materia seca, la tasa de pasaje, la absorción y excreción de los metabolitos ruminales (Grant; Mertens, 1992 b; Yang *et al.*, 2002; Zebeli *et al.*, 2007; Reynolds; Kristensen, 2008; Zebeli *et al.*, 2008).

El efecto más notable del pH sobre los alimentos se observa cuando este se encuentra por debajo de 6.

Para Zebeli *et al.* (2008) el valor promedio de pH de 6,16 permite tener un pH inferior a 5,8 durante 5,24 h día⁻¹.

El principal inconveniente de los valores bajos de pH en el rumen por varias horas es la pérdida de eficiencia en la alimentación, debido principalmente a la disminución de la digestibilidad de la MS (Yang *et al.*, 2002; Zebeli *et al.*, 2007).

Por otra parte, los altos niveles de ingestión se asocian con un tránsito más rápido y un pH más bajo, el promedio de pH cae por debajo del umbral de 6,25 cuando el consumo de MS excede de aproximadamente el 2,5% del peso corporal (Sauvant *et al.*, 1999).

Analizando cuánto tiempo el pH se observó debajo de 6, se puede apreciar que la fermentación de los alimentos fue intensa, ya que la RCM sub promedio las 15 horas diarias por debajo de pH 6 y la RCM ens las 10 horas (Tabla 9).

Si bien la alta producción de AGV es el principal objetivo en la alimentación de vacas lecheras de alta producción, no siempre se logra la mejor respuesta productiva debido al descenso del pH, debido principalmente al efecto que posee sobre la digestibilidad de los alimentos.

Para Zebeli *et al.* 2008 el tiempo por día que el pH se encuentra por debajo de lo óptimo (pH 6) es un mejor estimador de la degradación de la FDN que el promedio diario de pH.

Varios autores coinciden en que la disminución del pH por debajo de 6 disminuye la tasa de digestión de la FDN, aumenta el "lag time" y la tasa de pasaje (Grant; Weidner, 1992; Grant; Mertens, 1992 a; Grant; Mertens 1992 b; Grant, 1994; Calsamiglia *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2002; Zebeli *et al.*, 2008).

Estudios *in vitro* en especial en fermentadores de doble flujo continuo, han encontrado una disminución de la degradabilidad de la FDN a partir de 4 horas por día y un efecto más pronunciado a partir de las 8 horas por día a un pH debajo de 6 (Calsamiglia *et al.*, 2002; Cerrato-Sánchez *et al.*, 2007).

Estudios *in vivo* han observado los mismos efectos al disminuir el promedio de pH de 6,37 a 5,78 con un tiempo que osciló entre 154 a 937 minutos día, sin embargo, este trabajo no tuvo en cuenta el "lag time" para modelar la cinética de degradación (Krajcarski-Hunt *et al.*, 2002).

La fermentación de los alimentos por los microorganismos en el rumen y la producción de AGV es una condición deseable en los rumiantes. Sin embargo, éstos afectan las poblaciones de microorganismos que se desarrollan en el rumen considerando como principal factor la dinámica del pH (Russell; Wilson, 1996).

Retomando el concepto de Goering; Van Soest (1970) la digestibilidad de la FDN por parte de los microorganismos es lo que más va a afectar la digestibilidad de la MS.

Los tiempos prolongados por debajo de pH 6 observados limitan la digestibilidad de la MS, por lo tanto la eficiencia de utilización de las RCM.

La máxima cantidad de FDN digerida ocurre entre 6 a 18 h después de la ingestión, dependiendo de la tasa de digestión (Van Soest, 1994 c).

La concentración de AGV en el rumen observado en el ensayo II, para las RCM sub y RCM ens promedio los 90 mm l⁻¹, que está dentro de los rangos normales de 60 a 150 mm l⁻¹ en el fluido ruminal (Bergman, 1990).

Los AGV no presentaron diferencias entre tratamientos, pero sí presentaron diferencias entre períodos.

Ambos tratamientos expresaron una mayor concentración de AGV en el rumen en el período 2 asociado a un mayor consumo de materia seca.

Es de esperar que la RCM ens se comportara sobre el metabolismo como un dieta lipogénica y la RCM sub como glicogénica considerando la relación acético:propiónico (Firkins *et al.*, 2006). En ésta última, la respuesta metabólica sería un aumento de la insulina y glucosa, y una disminución de los AGNE.

Si bien las concentraciones hormonales y de metabolitos se cuantificaron en el ensayo I, la RCM sub presentó mayor concentración de AGNE y un menor nivel de insulina y glucosa que la RCM ens.

Este perfil metabólico y hormonal es más lipogénico que glicogénico. Las dietas lipogénicas se asocian a una mayor cantidad de grasa y a una disminución de proteína en leche.

Sobre el balance de energía las dietas extra glicogénicas conducen a una menor pérdida de peso que las dietas lipogénicas (Van Kneegselet *et al.*, 2005).

Vacas que consumen RCM con distintas concentraciones de forrajes y concentrados e incluso una dieta donde los ingredientes eran administrados por separado, se obtuvo un consumo promedio 18,17 kg Ms día⁻¹.

El contenido ruminal total húmedo fue de 89,75 kg, con un volumen líquido del rumen de 76,50 l y con un contenido ruminal de 13,25 KgMS Maekawa *et al.* (2002), valores similares a los reportados por Penner *et al.* (2009).

Si los tratamientos, contenían 94,25 y 90,12 mmol l⁻¹ de AGV en el líquido ruminal y suponiendo que las vacas en promedio tienen 80 l de volumen de líquido ruminal, la concentración de AGV sería de 7,54 y 7,20 mol para RCM sub y RCM ens, respectivamente.

Por otro lado, si se utiliza la regresión lineal propuesta por Sutton *et al.* (2003) para la producción total diaria de AGV, los tratamientos producirían 84,88 y 80,73 mol AGV día⁻¹ para RCM sub y RCM ens, respectivamente.

Si bien la regresión lineal propuesta por Sutton *et al.* (2003) fue realizada en vacas con un volumen ruminal de 60 litros, ésta permite aproximar a una producción diaria de AGV, pero el autor sostiene que en vacas que consumen más de 25 KgMS día⁻¹ de RCM se subestima la producción total diaria de AGV.

Reflexionando, si los AGV presentan una tasa de absorción en rumen de 2 mol h⁻¹, en 24 h se absorberían 48 mol día⁻¹ en rumen y con una tasa de pasaje del rumen de 1

mol h⁻¹ en 24 horas, pasarían 24 mol día⁻¹ al tracto gastrointestinal posterior y la neutralización por el sistema bicarbonato-fosfato sería de 32 mol H⁺ día⁻¹.

Si se considera que son valores máximos para absorción, pasaje y neutralización, a mayores producciones diarias de AGV en el rumen, el animal se acercaría al límite de los mecanismos fisiológicos para contrarrestar los valores de pH observados en producciones diarias de AGV superiores a 104 mol de AGV día⁻¹.

En este trabajo hubiera sido conveniente medir concentración de AGV a la hora 0, y luego a diferentes horarios, para entonces poder determinar producción y no mera concentración de AGV.

En el estudio realizado por Penner *et al.* (2009) encontraron que dos dietas, alta y baja en concentrados, presentaron la misma tasa de absorción (23,4 % h⁻¹) y de pasaje (9,6 % h⁻¹) para AGV, a pesar de haber presentado valores de pH de < 5,8 por 376 min día⁻¹ y 10 min día⁻¹.

Para Penner *et al.* (2009) el metabolismo de la célula ruminal no presentó diferencias en la expresión de los genes encargados de la absorción y metabolismo de los AGV.

Las vacas con alto concentrado tuvieron menor expresión de genes de activación de AGV, cetogénesis y metabolismo de piruvato, que las vacas de bajo concentrado.

Además, evaluaron los genes encargados de mantener el pH intracelular del epitelio ruminal y no encontraron diferencias en la expresión génica.

Los tratamientos RCM sub y RCM ens presentaron más de tiempo por debajo de pH < 6, que lo descrito por Penner *et al.* (2009), la absorción, el metabolismo y la regulación del pH en el epitelio ruminal, no se afecta por presentar 376 min día⁻¹ de pH < 6.

El efecto de períodos más prolongados de pH < 6 es incierto en cuanto a la expresión génica de los genes que regulan la absorción y metabolismo de AGV.

Las concentraciones de N-NH₃ observadas fueron para RCM sub 33,17 mg dl⁻¹ y la RCM ens 30,49 mg dl⁻¹.

La concentración mínima de N-NH₃ para una adecuada síntesis de proteína microbiana es de 5 mg dl⁻¹ en dietas fibrosas (Satter *et al.*, 1974) y para obtener la tasa máxima de degradación de la MS, se requiere una concentración de 23,5 mg dl⁻¹ N-NH₃ (Mehrez *et al.*, 1977).

Ambos tratamientos, presentaron valores superiores a los mínimos requeridos para la síntesis microbiana y un valor superior al máximo para la degradación de la materia

seca, a pesar de presentar concentraciones diferentes de urea en las RCM (RCM sub 0,4 % y RCM ens 0,8 %) los valores de N-NH₃ fueron similares.

En ensayos donde se compararon cantidades crecientes de urea en la dieta con diferentes porcentajes de proteína bruta, se encontró que a medida que aumenta la urea y la concentración de PB en la dieta, también lo hace el N-NH₃ en el líquido ruminal (Kang-Meznarich; Broderick, 1980; Boucher *et al.*, 2007).

Sin embargo, ambos autores encontraron que concentraciones de N-NH₃ mayores a 13,6 y 17,4 mg dl⁻¹, se asociaron a una menor síntesis de proteína microbiana por gramo de MO degradada.

Por otra parte, Mehrez *et al.* (1977) encontró que con valores superiores de 23,5 mg dl⁻¹ N-NH₃ la degradación de la MS llega a una meseta.

En cambio, Kang-Meznarich; Broderick, (1980) y Boucher *et al.*, (2007) trabajando sobre la digestibilidad de la MS.

Observaron que a medida que la concentración de N-NH₃ aumentaba, la digestibilidad de la MS se mantenía constante, entre los valores de 8,5 a 28 mg dl⁻¹ N-NH₃.

Pero la síntesis de proteína microbiana disminuía a medida que aumentaba la concentración de N-NH₃, los valores donde comenzó a disminuir la síntesis de proteína microbiana fueron de 12 y 13 mg dl⁻¹ N-NH₃.

En este trabajo, como se expresó en el ensayo I la DMS fue similar para los dos tratamientos y la concentración de N-NH₃ superior a los 30 mg dl⁻¹, lo que hace suponer que la síntesis de proteína microbiana no alcanzó su máximo nivel de expresión.

En el tratamiento RCM sub se analizó la cinética de digestión de la FDN de la raicilla de cebada y para la RCM ens el ensilaje de planta entera de maíz, que eran los componentes de las RCM que más FDN aportaban.

El ensilaje de planta entera de maíz presentó mayor degradación potencial, mayor fracción soluble y mayor "lag time" de la FDN, que la raicilla de cebada (P < 0,05).

Esto fue estudiado por Grant; Mertens, 1992 b; Fernandez *et al.*, 2003; Ouellet *et al.*, 2003; Boucher *et al.*, 2007; Rossi *et al.*, 2010, quienes encontraron resultados similares de cinética de digestión de la FDN, en ensayos *in vivo* e *in vitro*.

En el presente trabajo, se observó una menor fracción soluble de la raicilla de cebada que en el estudio de Swain; Armentano (1994).

En cuanto a la tasa de degradación, se observó una tendencia a ser menor y un "lag time" mayor para la FDN de ensilaje de planta entera de maíz que para la FDN de raicilla de cebada.

En el estudio realizado por Grant; Mertens (1992 c) una menor tasa de degradación y mayor "lag time" estuvo asociado a un pH menor a 5,8.

En este trabajo las vacas alimentadas RCM ens el pH permaneció 10,6 horas por debajo de 6 y en las vacas alimentadas con RCM sub esa situación se prolongó por 15,16 horas.

Los resultados de la cinética de digestión muestran que los valores de los parámetros son más bien un efecto de las características intrínsecas de la fibra antes de que efectos diferenciales de pH.

Si se considera la degradación efectiva de la FDN a una tasa de pasaje de $2,7\% \text{ h}^{-1}$ (36 h), la raicilla de cebada presentó una tendencia ($P = 0,10$) a ser mayor que el ensilaje de planta entera de maíz (38,81 % y 28,66% DEFND).

Bajo las condiciones de ambiente ruminal, dadas por las RCM, la FDN de raicilla de cebada y del ensilaje de planta entera de maíz, presentan patrones de cinética de digestión similares.

El modelo utilizado para describir el tracto gastrointestinal, fue de dos compartimientos uno mezcla y el otro tubular. El tiempo de retención en retículo rumen fue de 39,6 y 36,4 h para RCM sub y RCM ens, respectivamente.

La FDN del alimento para desaparecer del rumen necesita de dos procesos: una hidrólisis enzimática de los microorganismos ruminales y el pasaje hacia el intestino. Estos dos factores combinados determinan la degradación de la FDN.

El uso de fibra marcada con cromo torna a la fibra indigestible, única manera de impedir la digestión enzimática permitiendo su paso del retículo rumen hacia el compartimiento tubular (omaso, abomaso e intestino delgado y grueso).

Para Fernández (1985), si un marcador es digestible, la velocidad de pasaje se sobrestima, además, sostiene que no tiene sentido hablar de velocidad de pasaje de un marcador digestible, por lo tanto la velocidad de pasaje de sólidos son aplicados a marcadores indigestibles.

Aunque esta ventaja puede afectar la cinética de pasaje del marcador, una mayor densidad y una menor digestibilidad puede hacer que el material se comporte de forma diferente a la FDN no marcada (Desbordes; Welch, 1984; Kaske *et al.*, 1992).

El tiempo de retención en retículo rumen de 39,6 a 36,4 h fue similar a otros trabajos donde se alimentaron con RCM a vacas lecheras (Teimouri Yansari *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2010).

Sin embargo, Yang; Beauchemin (2006) encontraron que a medida que la fibra efectiva era más alta en las RCM, la tasa de pasaje aumenta con respecto a las RCM con fibra efectiva más baja (26 a 22 h).

Aseveraron, que la tasa de pasaje se relaciona más con la fibra efectiva que contienen las RCM, que con el tamaño de partícula de los alimentos empleados en las mismas.

5.2. Segunda parte: ensayo *in vitro*.

Los sistemas *in vitro* de fermentadores de doble flujo continuo permiten controlar tasas de pasajes para sólidos y líquidos, simular condiciones establecidas de ambiente ruminal y evaluar el efecto de los microorganismos ruminales sobre las dietas, entre otras.

Además de ofrecer una alternativa al uso de animales en ensayos debido a que las normas sobre el bienestar son cada vez más exigentes.

En el ensayo III, las RCM presentaron similares características de digestibilidad y ambiente ruminal, al comparar las tasas de digestión de RCM sub y RCM ens, presentaron patrones similares de sus distintos componentes (Tabla 16).

Los fermentadores de doble flujo continuo permiten un control más preciso de las tasas de pasajes de líquidos y sólidos (Hoover *et al.*, 1984; Schadt *et al.*, 1999).

Sin embargo, el efecto que producen las tasas de sólidos y líquidos sobre la digestibilidad de los componentes de las dietas depende del pH.

La FDN es el componente que más se afecta por el pH menor a 6, con tasas de pasajes de líquidos menores a 10 % h⁻¹ y con tasas de pasajes de sólidos constantes de 5 % h⁻¹, la digestibilidad de la FDN disminuye si el pH baja de 6 (Hoover *et al.*, 1984; Calsamiglia *et al.*, 2002).

En estos sistemas la digestibilidad de la MS y de la FDN aumenta, a medida que lo hace el tiempo de retención de sólidos entrando en una meseta a partir de las 28 horas de retención (Crawford *et al.*, 1980; Hoover *et al.*, 1982; Schadt *et al.*, 1999).

En el estudio realizado por Crawford *et al.* (1980) sostienen que *in vivo* se podría alcanzar la digestibilidad óptima de la MS, cuando la tasa de pasaje de sólidos es entre 3,3 y 4,5 % h⁻¹ y la de líquido entre 11 y 15 % h⁻¹.

En el presente estudio la tasa de pasaje utilizada fue de 9,5 y 4,66 % h⁻¹ para líquidos y sólidos, se podría inferir que la digestión de la materia seca pudo estar cerca de su potencial.

En fermentadores, el efecto del pH, sobre la degradabilidad de la FDN ha sido atribuido a diferentes condiciones.

Entre otras, la reducción de pH impide la adhesión de las bacterias celulolíticas sobre las partículas del alimento (Cheng *et al.*, 1980).

Además, se produce un aumento del gasto metabólico de las bacterias al eliminar protones disminuyendo la tasa de replicación y por efecto de lavado en el aumento de tasa de pasaje de líquidos disminuye la población de bacterias celulolíticas (Russell; Dombrowski, 1980).

En el trabajo de Calsamiglia *et al.* (2002), comparan efectos del pH menor a 6 unidades por periodos de horas diarias, y encontraron que la degradabilidad de la MS y FDN se afectó cuando el pH fue menor a 6 durante todo el día, al compararlo con ciclos de pH menor a 6 durante 4 horas y a pH mayor a 6 durante todo el día.

Por otro lado Calsamiglia *et al.* (2002) y Sauvant *et al.* (1999) sostienen que, en ciclos menores a 4 h día⁻¹ de pH menor a 6, su efecto es insignificante sobre el perfil de fermentación ruminal.

Ambos tratamientos permanecieron menos de 4 horas a pH < 6 (Tabla 15), a diferencia de lo observado en el ensayo II que permanecieron más de 10 h día⁻¹ a un pH < 6 (Tabla 9).

El efecto del pH sobre la degradación de los componentes de las RCM en los fermentadores no se evidenció.

La concentración de AGV fue de 84,93 y 86,18mmol l⁻¹ para RCM sub y RCM ens, similares a otros estudios realizados en fermentadores de doble flujo continuo (Hoover *et al.*, 1982; Schadt *et al.*, 1999; Griswold *et al.*, 2003).

Aunque la concentración total fue inferior para ambos tratamientos al compararlo con lo observado en el ensayo II.

Crawford *et al.* (1980) observó que a medida que la tasa de pasaje de líquidos aumenta y la tasa de sólidos disminuye, la producción de AGV aumenta.

Además, encontró que la máxima producción de AGV se produce a tasa de pasajes sólidos de 4,5 % y de líquidos de 11 %, similares a las empleadas por el presente trabajo.

La relación acético:propiónico fue similar para los tratamientos bajo las condiciones *in vitro*, coincidente con la relación acético:propiónico observada en el ensayo II, aunque las proporciones milimolares observadas fueron superiores en este último.

La concentración de N-NH₃ fue similar entre los tratamientos para RCM sub y RCM ens (8,90 y 7,90 mg dl⁻¹), valores similares fueron reportados en otros estudios (Hoover *et al.*, 1982; Griswold *et al.*, 2003).

En fermentadores la concentración de N-NH₃ se ve afectada por el tiempo de retención de sólidos, a medida que esta aumenta se incrementa la concentración (Hoover *et al.*, 1982; Schadt *et al.*, 1999).

A pesar de tener dos concentraciones diferentes de urea y con similar concentración de PB en las RCM, no se observó un incremento en la PDR, presentando valores semejantes para RCM sub y RCM ens (Tabla 16).

La adición de urea y nivel de PDR en las dietas, demostraron aumentos sobre la digestión de MS, MO y FDN (Griswold *et al.*, 2003).

En términos generales, la eficiencia de síntesis de proteína microbiana ronda entre los valores de 20 a 30 g N kg MO⁻¹ verdaderamente digestible (Hoover *et al.*, 1982; Calsamiglia *et al.*, 2002; Griswold *et al.*, 2003), pero esta eficiencia de síntesis puede estar afectada por el pH y la tasa de pasaje de líquidos.

En general, a pH ácidos y a tasa de pasaje de líquidos bajas de 4,5 % h⁻¹ la eficiencia de síntesis aumenta, y cuando la tasa pasaje de líquidos aumenta y el pH se mantiene ácido, la eficiencia disminuye.

A pH neutros la eficiencia de síntesis se mantiene constante, aunque se aumente la tasa de pasaje de líquidos (Hoover *et al.*, 1982).

Para Calsamiglia *et al.*, (2008) observaron que a tasas de pasajes de líquidos y sólidos fijas (10 % h⁻¹ y 5 % h⁻¹) con rangos de pH de 4,9 a 7 la eficiencia de síntesis microbiana se mantiene constante.

Dado que en el presente trabajo las tasas de pasajes de líquidos y sólidos utilizadas fueron similares a las de Calsamiglia *et al.*, (2008) y que el pH se situó dentro de los rangos citados por ellos, es muy probable que la eficiencia de síntesis de proteína microbiana no se haya afectado.

La concentración energética de las RCM determinado en fermentadores es inferior a la DIVMS utilizando un incubador DAISY II (ANKOM Corp., Macedon, New York), según Van Soest (1994a), esto es debido principalmente al tiempo de retención de sólidos que en los fermentadores fue de 21,4 h y en la DIVMS es de 48 h.

Por lo tanto, su comparación debe ser limitada, debido a lo dicho y al efecto de otras variables.

Sólo se puede hacer comparación entre métodos, si se tienen en cuenta las principales variables y el control que se tienen de ellas en los distintos métodos. Cada una de ellas se puede ajustar teniendo en cuenta el objetivo de trabajo y la finalidad de la inferencia generada.

5.3. Tercera parte: puntos en común de ensayos *in vivo* e *in vitro*.

El desarrollo de los ensayos para comparar los tratamientos sobre los animales, los fermentadores y sus respectivas respuestas permiten evidenciar algunas cuestiones que se discuten a continuación.

La digestibilidad de la MS de los alimentos y su conversión en productos de origen animal es uno de los objetivos de todo productor.

Las RCM son herramientas que poseen los sistemas productivos para ser empleadas en condiciones continuas o discontinuas lo largo de un ciclo productivo.

El uso de subproductos agroindustriales en producción animal en Argentina, va a ser cada día más creciente, principalmente por el avance de la agroindustria en zonas del país donde aún la actividad es incipiente.

El interés que presentan las agroindustrias, los intermediarios comerciales y los productores por conocer las características nutricionales de los subproductos agroindustriales, motivó a plantear los objetivos de la presente tesis.

Se puede observar que según como se evalúe se encuentran diferentes resultados.

La digestibilidad de la MS teórica de las RCM era de 72 % y presentó una DIVMS de 66,14 y 67,33 %.

Al realizar el balance energético 0 %, para el consumo observado, la DIVMS debería ser de 53,94 y 54,42 %, para RCM sub y RCM ens, respectivamente.

Al observar los resultados de la digestibilidad de la MS en los fermentadores para RCM sub y RCM ens (55,06 y 56,82 %) se acercan al valor de digestibilidad MS para un balance energético 0 %.

Es muy difícil establecer cuáles son los motivos exactos de tales diferencias en un sistema tan complejo como el aparato digestivo de los rumiantes, pero se puede, en base a los resultados obtenidos hacer algunas interpretaciones.

El primero es en relación al consumo de materia seca, el principal factor que afecta la digestibilidad, si se considera al aparato digestivo como un sistema tubular con una

capacidad definida de volumen, cuando este volumen es superado por el consumo, aumenta el pasaje del alimento a través del mismo.

El tiempo que es retenido el alimento dentro del sistema digestivo afecta la digestibilidad del mismo. Es evidente que la digestibilidad de la MS depende de la tasa de digestión y de la tasa de pasaje.

El constituyente de los alimentos que más se afecta por la tasa de pasaje es la FDN, esto es debido a que su tasa de digestión depende de mecanismos de la microflora ruminal e intestinal (adhesión, hidrólisis enzimática, metabolismo de los compuestos hidrolizados).

Si la tasa de pasaje es más rápida que la capacidad de los microorganismos para colonizar, multiplicarse y degradar la FDN, ésta ve afectada su digestibilidad.

Por lo tanto, en las RCM donde la FDN rondó los 39 % de la MS es un factor importante en la digestibilidad potencial de la MS.

Las respuestas metabólicas, productivas y de ambiente ruminal de las vacas fueron similares.

Esto es debido, a que las RCM fueron formuladas en concentraciones isoenergéticas y iso proteicas, pese a, que los alimentos que las componían, eran de origen y calidad muy diferentes.

En relación al supuesto de que la digestibilidad de la FDN de la RCM sub debería ser superior a la de RCM ens, principalmente por el origen diferente de la FDN.

Al comparar la degradabilidad de la FDN de las RCM en los fermentadores presentaron la misma degradación.

Sin embargo, el efecto que más debe haber afectado la digestibilidad de la MS *in vivo* es el pH.

El tiempo que las vacas presentaron por debajo de $\text{pH} < 6$ superó lo recomendado para estudios *in vivo* e *in vitro* sobre digestibilidad de FDN.

Por lo cual, es muy probable que la respuesta productiva de las vacas haya sido afectada por el pH.

Los resultados obtenidos de pH y de tasas de pasajes de líquidos y sólidos en los fermentadores, son las recomendadas para encontrar la máxima digestibilidad de los alimentos.

En las vacas las tasas de pasajes de sólidos observadas de $2,6 \% \text{ h}^{-1}$ y con un tiempo de más de 10 h con un $\text{pH} < 6$, se podría inferir que la digestibilidad de la MS no fue la máxima esperada, esto es especulativo, ya que la única evidencia de esto es el balance energético estimado.

Sin embargo, algo de destacar, es que la digestibilidad de la MS en varios estudios (Crawford *et al.*, 1980; Hoover *et al.*, 1982; Schadt *et al.*, 1999) a partir de 30 h de retención de sólidos, presenta una meseta que en términos de tasas de digestión.

Se puede entender de la siguiente manera: antes de las 30 h las tasas de digestión son más altas, es decir, las pendientes son más altas.

Posterior a las 30 h donde las pendientes son más bajas, las curvas de digestión se ajustan más a una ecuación no lineal que lineal.

Sin embargo, para describir la digestibilidad, la mayoría de los modelos matemáticos utilizados son lineales, donde las pendientes son constantes, esto es debido a que los métodos lineales son más simples de aplicar.

En teoría, la digestibilidad es la proporción de un nutriente ingerido que es digerido y absorbido.

No obstante, ya que es imposible recoger y medir lo que se digiere y se absorbe desde el alimento, cualquier fracción de la alimento que no aparece en las heces (es decir, desaparece durante su paso a través del tracto digestivo) puede considerarse digerido y absorbido.

Así, la digestibilidad la podemos definir como la porción que no se excreta en las heces y que se supone que tiene haber sido absorbido por el animal.

La digestión incompleta de los alimentos en el tracto gastrointestinal, representa la principal pérdida de nutrientes durante la utilización de la ración por el animal y es también la principal fuente de variación del valor nutritivo de una ración.

6. CONCLUSIONES.

La utilización de subproductos agroindustriales, en RCM tuvo el mismo nivel productivo que en vacas lecheras alimentadas con una ración en base a ensilaje de planta entera de maíz. Por lo tanto, la hipótesis planteada en el presente estudio se rechaza.

La energía metabolizable de las raciones evaluadas en fermentadores de doble flujo continuo fue similar en ambos tratamientos. Esta situación puede deberse a que la digestibilidad de la FDN de las RCM no varió.

Los bajos valores de pH pueden haber contribuido a la baja digestibilidad aparente de ambas RCM.

IMPLICANCIAS

La proyección sobre la utilización de subproductos agroindustriales en raciones completamente mezcladas para vacas lecheras es muy positiva, debido principalmente al alto costo de reciclado que posee para las agroindustrias y el impacto ambiental que poseen los subproductos agroindustriales para la sociedad.

Sin embargo, estudios complementarios sobre el aporte de fibra efectiva y niveles de inclusión en las raciones de los subproductos agroindustriales son necesarios.

7. APENDICE I

7.1. Estimación del balance energético y proteico de las vacas.

7.2. Fórmulas utilizadas para el cálculo de total de nutrientes digestibles de las raciones completamente mezcladas.

Para estimar la energía digestible (ED) de las RCM, se multiplicó la energía bruta (EB) de cada RCM por los resultados de digestibilidad aparente de materia seca (DaMS) del laboratorio por DAISY (DaMS %, 66,14 RCM sub y 65,26 RCM ens) y los resultados obtenidos de los fermentadores (DaMS %, 55,06 RCM sub y 56,82 RCM ens). Los valores teóricos de EB fueron: para proteína bruta (PB) EB 5,7 Mcal kg⁻¹, hidratos de carbono (HDC) EB 4,2 Mcal kg⁻¹ y extracto etéreo (EE) EB 9,5 Mcal kg⁻¹ según valores descriptos por NRC (2001).

$$\text{HDC} = 100 \% - (\text{PB} \% + \text{EE} \% + \text{cenizas} \%)$$

$$\text{EB} = [(\text{PB} \times 5,7) + (\text{EE} \times 9,5) + (\text{HDC} \times 4,2)]$$

$$\text{ED} = \text{EB} \times \text{DaMS}$$

Para estimar los valores de TND, se utilizó la ED dividido por la EB de cada RCM. Donde energía digestible (ED), total de nutrientes digestibles (TND), energía metabolizable (EM) y energía neta de lactancia (ENI).

$$\text{ED (Mcal KgMS}^{-1}\text{)} = 0,04409 \times \text{TND (\%)}. \text{ Por lo tanto:}$$

$$\text{TND (\%)} = \text{ED (Mcal KgMS}^{-1}\text{)} / \text{EB de cada RCM}$$

$$\text{EM (Mcal kg}^{-1}\text{)} = 1,01 \times \text{ED (Mcal kg}^{-1}\text{)} - 0,45$$

$$\text{ENI}_{\text{RCM}} \text{ (Mcal kg}^{-1}\text{)} = 0,0245 \times \text{TND (\%)} - 0,12$$

7.3. Fórmulas utilizadas para estimar el consumo de materia seca y los requerimientos energéticos de las vacas.

El consumo de materia seca fue estimado con la ecuación propuesta por el NRC (2001), con el fin de comparar el consumo observado en el ensayo.

$$\text{Consumo MS (kg Día}^{-1}\text{)} = (0,375 \times \text{LGC} + 0,0968 \times \text{PV}^{0,75}) \times (1 - e^{(-0,192 \times (\text{SEML} + 3,67))})$$

Donde LGC, es leche grasa corregida y SEML es semana de lactancia. Para los cálculos se utilizó 33 semanas y la producción de leche (PDL) con una concentración de grasa en leche de 3,4 % (este valor se asume).

$$\text{LGC (l día}^{-1}\text{)} = 0,4 \times \text{PDL} + 15 \times (3,4 \% / 100) \times \text{PDL}$$

Para estimar el Consumo de MS para mantenimiento (CMSm), que es la ingesta necesaria para cumplir con los requerimientos de mantenimiento, se utilizó la siguiente fórmula.

$$\text{CMSm (KgMS día}^{-1}\text{)} = \text{totalTND} / (0,0035 \times \text{PV}^{0,75})$$

TotalTND es % de TND de las RCM sub y RCM sub.

Para ajustar los TND de la RCM sub que presentó más de 3% de EE, se utilizó la siguiente ecuación (para el RCM ens no aplica debido a que el EE es <3%).

$$\text{Digestibilidad grasa (DG)} = \text{EE\%} - 1$$

$$\text{TNDadj (\%)} = \text{TND}_{\text{dieta}} - (((\text{EE\%} - 3) \times (\text{DG} / \text{EE\%})) \times 2,25)$$

$$\text{TNDconc (\%)} = \text{TNDadj} / ((100 - (\text{EE\%} - 3)) / 100)$$

Para estimar la depresión de la digestibilidad en TND que sucede por arriba del nivel de mantenimiento, se utilizó el descuento variable (DV). Cuando el DV es < 0 y los TND < 60 % el DV se considera 1, cuando es mayor a estos dos índices se aplica el descuento (D).

$$DV = ((0,18 \times TDN_{conc}) - 10,3) \times CMSm - 1$$

$$D = (TND_{conc} - DV) / TND_{conc}$$

Para el tratamiento RCM ens se consideró TND_{conc} como el % TND de la MS.

Para TND actual (TND_{dact}) por incremento de consumo por encima de mantenimiento, aplicado al tratamiento RCM sub se calculó de la siguiente forma.

$$TND_{dact} (\%) = TND (\%) \times D$$

La estimación de cada RCM de la energía metabolizable y de la energía neta lactancia para el nivel de consumo observado, depende del % EE de cada RCM.

Para RCM sub EE > 3%:

$$\text{DiscED (Mcal KgMS}^{-1}) = 0,04409 \times TND_{dact} (\%)$$

$$\text{Energía Metabolizable (EMng) (Mcal KgMS}^{-1}) = (1,01 \times \text{DiscED}) - 0,45 + (0,0046 \times (\text{EE}\% - 3))$$

$$\text{Energía neta lactancia (Mcal KgMS}^{-1}) = (0,703 \times \text{EMng}) - 0,19 + (((0,097 \times \text{EMng}) + 0,19) / 97) \times (\text{EE}\% - 3)$$

Para RCM ens EE < 3%:

$$\text{DiscED (Mcal KgMS}^{-1}) = 0,04409 \times TND_{dact} (\%)$$

$$\text{Energía Metabolizable (EMng) (Mcal KgMS}^{-1}) = (1,01 \times \text{DiscED}) - 0,45$$

$$\text{Energía neta lactancia (Mcal KgMS}^{-1}) = (0,703 \times \text{EMng}) - 0,19$$

Para estimar de cada RCM el aporte total en energía de la dieta por día:

$$\text{ENI total (Mcal día}^{-1}) = \text{Consumo MS kg día}^{-1} \times \text{ENI}_{RCM} (\text{Mcal kg}^{-1})$$

Las necesidades energéticas de las vacas se calcularon de forma factorial considerando mantenimiento, producción, gestación y cambio de peso vivo a partir de las recomendaciones del NRC (2001) para energía neta de lactancia (ENI).

Las necesidades de energía neta de mantenimiento (EN_m) se calcularon en función del peso vivo (PV).

$$EN_m \text{ (Mcal día}^{-1}\text{)} = 0,080 \times (PV-PC)^{0,75}$$

$$\text{Peso del ternero gestante (kg)} = PC = (18 + ((Dp - 190) \times 6,665)) \times (PVN / 45)$$

Se consideró 120 días de preñez (Dp) y un peso al nacimiento del ternero (PVN) de 45 kg, donde el peso del ternero gestante es de 24,65.

Las necesidades de producción de leche se calcularon en función de la energía neta de la leche (EN_{leche}) asumiendo para su estimación que las vacas produjeron un contenido de proteína 3,53 % y 3,4 % de grasa. Para obtener el requerimiento diario de energía neta para la producción se multiplicó por la correspondiente producción diaria de leche (PDL), obteniendo energía neta de producción de leche (EN_p).

$$EN_{leche} \text{ (Mcal kg de leche}^{-1}\text{)} = (0,0929 \times \text{grasa (3,4\%)} + (0,0547 \times \text{Proteína bruta (3,53\%)} / 0,93] + 0,192$$

$$EN_p \text{ (Mcal día}^{-1}\text{)} = \text{Enleche} \times \text{PDL}$$

Las necesidades de energía neta de la gestación (EN_{ges}) se consideraron nulas antes de los 190 días de gravidez. Se consideró 200 días de gestación y se utilizó la siguiente ecuación.

$$EN_{ges} \text{ (Mcal día}^{-1}\text{)} = [(0,00318 \times Dp - 0,0352) \times (PVN / 45)] / 0,14$$

Donde Dp representa los días de preñez y PVN es el peso vivo del ternero al nacimiento en kg (se consideró un peso de 45 kg).

Para las necesidades energía neta de cambio de peso (EN_g), se utilizaron los valores energéticos ($ENI \text{ Mcal kg}^{-1}$) de depósito o movilización de 1 kg de peso de

cuerpo vacío de una condición corporal 3 (5,34; 4,68), respectivamente. El peso vivo se ajusta al peso del cuerpo vacío (PCV).

$PCV \text{ (kg)} = 0,817 \times \text{peso vivo (kg)}$, por lo tanto $PCV \text{ (kg)} = 0,817 \times \text{cambio de peso vivo (kg)}$

El balance energético fue calculado con la siguiente ecuación.

$$\text{Balance energía neta lactancia (Mcal día}^{-1}\text{)} = \text{ENI total} - (\text{EN}_m + \text{EN}_p + \text{EN}_{\text{ges}} + \text{EN}_g)$$

En el ensayo las vacas perdieron peso por lo que la ecuación fue.

$$\text{Balance energía neta lactancia (Mcal día}^{-1}\text{)} = \text{ENI total} - (\text{EN}_m + \text{EN}_p + \text{EN}_{\text{ges}} - \text{EN}_g)$$

En la tabla I, se presenta los valores utilizados para estimar el balance energético de las vacas según lo descrito. Se utilizó los resultados de digestión aparente de la materia seca obtenida en Daisy y en fermentadores de doble flujo continuo.

Tabla I. Efecto de dos dietas RCM sub y RCM ens, sobre la digestibilidad aparente de la materia seca y el balance energético estimado según Nutrient Requirements of Dairy Cattle, NRC (2001) comparando los ensayos I y III.

	DAISY		FDFC ^a	
	RCM ^b sub	RCM ^c ens	RCM sub	RCM ens
Peso vivo promedio de las vacas, Kg	572,81	598,72	572,81	598,72
Producción de leche, l día ⁻¹	25,96	24,88	25,96	24,88
Total nutrientes digestible, % MS	66,14	67,33	55,06	56,82
Consumo de MS para mantenimiento, KgMS día ⁻¹	16,14	15,89	13,44	13,41
Consumo de MS, KgMS día ⁻¹	24,82	24,15	24,82	24,15
Consumo MS sobre mantenimiento	1,54	1,52	1,85	1,80
TNDadj	65,55		54,47	
TNDconc	65,80	67,33	54,68	56,82
Descuento variable	0,83	0,95	-0,39	-0,06
Descuento	0,99	0,99	1,00	1,00
TNDact	64,97	66,38	54,68	56,82
Energía Digestible, Mcal KgMS ⁻¹	2,83	2,93	2,38	2,50
Energía Metabolizable, Mcal KgMS ⁻¹	2,41	2,51	1,95	2,08
ENI, Mcal KgMS ⁻¹	1,66	1,57	1,33	1,27
Aportes dieta ENI, Mcal día ⁻¹	41,27	37,95	32,97	30,72
Energía Neta de mantenimiento, Mcal día ⁻¹	9,06	9,38	9,06	9,38
Energía Neta de gestación, Mcal día ⁻¹	4,29	4,29	4,29	4,29
Energía Neta de la leche, Mcal día ⁻¹	0,73	0,73	0,73	0,73
Energía Neta de producción de leche, Mcal kg de leche ⁻¹	18,84	18,06	18,84	18,06
Requerimientos totales ENI, Mcal día ⁻¹	32,92	32,46	32,92	32,46
Cambio de peso de cuerpo vacío, kg día ⁻¹	-0,04	-0,51	-0,04	-0,51
ENI movilizada, día ⁻¹	0,23	2,91	0,23	2,91
Balance de Energía Neta lactancia, Mcal día ⁻¹	8,59	8,41	0,28	1,18
Exceso de energía (%)	21%	22%	1%	4%

a. Fermentador de doble flujo continuo. b. Ración completamente mezclada subproductos. c. Ración completamente mezclada ensilaje. Valores estimados según Nutrient Requirements of Dairy Cattle, NRC (2001).

7.4. Fórmulas empleadas para los requerimientos proteicos de las vacas.

Para el cálculo de necesidades de proteína se consideró lo recomendado por NRC (2001). Se define como proteína metabolizable, a la proteína absorbida en el intestino y es una suma de la aportada por la proteína microbiana y la proteína no degradada del alimento, ambas corregidas por su correspondiente digestibilidad.

Para proteína metabolizable de mantenimiento (PMm) se determina en función de proteína endógena urinaria, la proteína de la piel y pelos, la proteína fecal y la proteína procedente del resto de las secreciones endógenas. EL peso vivo (PV) y el consumo de materia seca (CMS) se expresan en kg y la proteína metabolizable bacteriana en g de $PM_{bacteriana}$. El total nutrientes digestibles se ajusta por la ingestión (TNDact).

$$PMm \text{ (g día}^{-1}\text{)} = (4,1 \times (PV-PC)^{0,50}) + (0,3 \times (PV-PC)^{0,60}) + ((30 \times CMS \text{ (kg)}) - 0,5 \times ((PM_{bacteriana} / 0,8) - PM_{bacteriana})) + PM_{endoreq}$$

$$\text{Peso vivo vaca (kg)} = PV$$

$$\text{Peso del ternero gestante (kg)} = PC$$

$$\text{Requerimientos de proteína endógena de PM en } PM_{endoreq} = MP_{Endo}/0,67$$

$$\text{Proteína metabolizable endógena (g día}^{-1}\text{)} = PM_{endo} = 0,4 \times \text{EndCP}$$

$$\text{Proteína cruda endógena (g día}^{-1}\text{)} = \text{EndCP} = 11,8 \times \text{CMS (kg)}$$

$$PM_{bacteriana} = 0,64 \times PCM_{total}$$

$$PCM_{total} = 0,13 \times (\text{TNDact \%} \times \text{CMS g})$$

$$\text{Rendimiento total microbiano} = PCM_{total}$$

Las necesidades de proteína metabolizable de gestación (PM_g) se calculó para vacas de 120 días de preñez (D_p) con una eficiencia de utilización para gestación de 33 %. El peso de vivo de nacimiento del ternero (PVN) es de 45 kg.

$$PM_g = (((0,69 \times D_p) - 69,2) \times (PVN/45)) / 0,33$$

Los requerimientos de proteína metabolizable de lactación (PM_L) se calculó a partir de la proteína neta presente en la leche, asumiendo una eficiencia de conversión de PM a proteína neta del 67 %. Para producción de proteína láctea (Y_{prot}) en $kg\ día^{-1}$, se asumió que un kg de leche requiere 0,0353 de proteína.

$$PM_L(g\ día^{-1}) = (Y_{prot} / 0,67) \times 1000$$

El NRC (2001) considera que para conocer la proteína metabolizable que proviene de la pérdida de peso primero hay que estimar la proteína metabolizable de crecimiento, que se aplica a todas las categorías.

$$\text{Proteína neta crecimiento (PNc)} (g\ día^{-1}) = 1 (kg) \times (268 - (29,4 \times (5,34 / 1(kg))))$$

Se asume 1 kg de ganancia de peso y una energía retenida de 5,34 que corresponde a una condición corporal de 3.

Como el peso reducido es mayor a 478 kg, se aplicó el coeficiente de eficiencia de utilización de la proteína neta ($EffPM_NPg$) es usada para ganancia de peso ($EffPM_NPg = 0,28908$).

$$\text{Proteína metabolizable crecimiento (PMc)} (g\ día^{-1}) = PNc / 0,28908$$

Si el animal está perdiendo peso, la proteína proporcionada por el catabolismo se calculó con la siguiente ecuación:

$$\text{Proteína metabolizable de pérdida de peso (PM}_{PP}) (g\ día^{-1}) = (-1 \times \text{pérdida de peso (kg)}) \times PMc \times 0,67$$

El balance de proteína metabolizable se realizó con la siguiente ecuación:

$$\text{Balance proteína metabolizable (g día}^{-1}) = (((PM_{alimento} + PM_{bacteriana} + PM_{endo}) - (PM_m + PM_g + PM_L - PM_{PP}))$$

Donde:

$$PM_{alimento} = \text{Total digerido de PNDR} = \text{PNDR}_{suministrada} / 0,8$$

Necesidades proteicas en el rumen.

El NRC (2001) establece que en función de las características de la ración se puede expresar la proteína degradable en rumen (PDR) y la proteína no degradable en rumen (PNDR) como porcentaje del total de proteína bruta del alimento. Se consideró una digestibilidad intestinal media de la PNDR del 80 %.

$$\text{PDR requerida (g día}^{-1}\text{)} = 0,15294 \times (\text{TNDact (\%)} \times \text{CMS (kg)} \times 1000)$$

$$\text{PDR suministrada (g día}^{-1}\text{)} = (\text{CMS (kg)} \times 1000 \times \text{PB}_{\text{alimento}}\%) \times \text{PDR \%}$$

$$\text{Balance PDR (g día}^{-1}\text{)} = \text{PDR suministrada} - \text{PDR requerida}$$

$$\text{PNDR suministrada (g día}^{-1}\text{)} = (\text{CMS (kg)} \times 1000 \times \text{PB}_{\text{alimento}}\%) - \text{PDR suministrada}$$

$$\text{PNDR requerida (g día}^{-1}\text{)} = (\text{total proteína bruta requerido} - (\text{PM}_{\text{bacteriana}} + \text{PM}_{\text{endo}})) / 0,80$$

$$\text{Balance PNDR (g día}^{-1}\text{)} = \text{PNDR suministrada} - \text{PDR requerida}$$

$$\text{Proteína bruta requerida (g día}^{-1}\text{)} = \text{PNDR requerida} + \text{PDR requerida}$$

Para los cálculos se asumieron los % de PDR y PNDR teóricas de cada RCM. Para realizar el balance proteico con los datos del ensayo III, se utilizó la digestibilidad aparente de la PB de cada RCM.

En la Tabla II, se muestran los resultados del balance de proteína del ensayo I y el ensayo III FDFC, donde se comparan las distintas digestibilidades ruminales para la proteína bruta del alimento. En el ensayo I se asume la digestibilidad teórica y en el ensayo III la observada para la proteína.

Tabla II. Efecto de dos dietas RCM sub y RCM ens, sobre la digestibilidad de la proteína bruta y el balance proteico estimado según Nutrient Requirements of Dairy Cattle, NRC (2001) comparando los ensayos I y III.

	Ensayo I		FDFC ^a	
	RCM sub ^b	RCM ens ^c	RCM sub	RCM ens
Peso vivo promedio de las vacas, Kg	572,81	598,72	572,81	598,72
Producción de leche, l día ⁻¹	25,96	24,88	25,96	24,88
TNDact	64,97	66,38	54,68	56,82
Consumo de MS, KgMS día ⁻¹	24,82	24,15	24,82	24,15
Alimento Proteína Bruta, % MS	17,1	16,5	17,10	16,50
Aporte dietario PB, g día ⁻¹	4244,22	3984,75	4244,22	3984,75
Cambio de peso vivo, kg día ⁻¹	-0,05	-0,62	-0,05	-0,62
Proteína neta crecimiento, g día ⁻¹	111,00	111,00	111,00	111,00
Proteína metabolizable crecimiento, g día ⁻¹	383,99	383,99	383,99	383,99
Proteína metabolizable del alimento, g día ⁻¹	1757,70	1138,14	2161,84	2127,22
Proteína metabolizable bacteriana, g día ⁻¹	1341,60	1333,86	1129,09	1141,67
Proteína metabolizable endógena, g día ⁻¹	117,15	113,99	117,15	113,99
Proteína metabolizable mantenimiento, g día ⁻¹	860,94	839,70	887,50	863,72
Proteína metabolizable gestación, g día ⁻¹	208,48	208,48	208,48	208,48
Proteína metabolizable lactación, g día ⁻¹	1355,96	1299,81	1355,96	1299,81
Proteína metabolizable de pérdida de peso, g día ⁻¹	12,86	160,02	12,86	160,02
Balance proteína metabolizable, g día ⁻¹	803,93	398,02	968,99	1170,89
PDR requerida, g día ⁻¹	2466,16	2451,93	2075,52	2098,65
PDR suministrada, g día ⁻¹	2047,10	2562,07	1541,93	1325,73
Balance PDR, g día ⁻¹	-419,06	110,14	-533,59	-772,92
PNDR requerida, g día ⁻¹	1192,21	925,16	1491,05	1195,42
PNDR suministrada, g día ⁻¹	2197,12	1422,68	2702,29	2659,02
Balance de PNDR, g día ⁻¹	1004,91	497,52	1211,24	1463,60
Proteína bruta requerida, g día ⁻¹	3658,37	3377,08	3566,57	3294,06
Proteína degradable rumen % de la PB, %	48,23	64,30	36,33	33,27
Proteína no degradable rumen % de la PB, %	51,77	35,70	63,67	66,73

a, Fermentador de doble flujo continuo. b, Ración completamente mezclada subproductos. c, Ración completamente mezclada ensilaje. Valores estimados según Nutrient Requirements of Dairy Cattle, NRC (2001).

8. BIBLIOGRAFÍA

- ADIN, G.; SÓLOMON, R.; NIKBACHAT, M.; ZENOU, A.; YOSEF, E.; BROSH, A.; SHABTAY, A.; MABJEESH, S. J.; HALACHMI, I.; MIRON, J. 2009. Effect of feeding cows in early lactation with diets differing in roughage-neutral detergent fiber content on intake behavior, rumination, and milk production. *Journal of Dairy Science*. 92:3364–3373.
- ALLEN, M. S. 1997. Relationship between fermentation acid production in the rumen and the requirement for physically effective fiber. *Journal of Dairy Science*. 80:1447–1462.
- ALLEN, M. S.; MERTENS, D. R. 1988. Evaluating constraints on fiber digestion by rumen microbes. *Journal of Nutrition*. 118:261 -270.
- ALLEN, M. S.; VOELKER, J. A.; OBA, M. 2006. Effective fiber and regulation of ruminal pH: its more than just chewing. In: *Production Diseases in Farm Animals*. Joshi, N. P.; Herdt, T. H. eds. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, Netherlands. pp 270-278.
- ALZAHAL, O.; KEBREAB, E.; FRANCE, J.; MCBRIDE, B. W. 2007. A mathematical approach to predicting biological values from ruminal pH measurements. *Journal of Dairy Science*. 90:3777–3785.
- ASCHENBACH, J. R.; PENNER, G. B.; STUMPF, F.; GÄBEL, G. 2011. Ruminant nutrition symposium: Role of fermentation acid absorption in the regulation of ruminal pH. *Journal of Animal Science*. 89:1092–1107.
- BARRIOS-URDANETA, A.; FONDEVILA, M.; CASTRILLO, C. 2003. Effect of supplementation with different proportions of barley grain or citrus pulp on the digestive utilization of ammonia-treated straw by sheep. *British Society of Animal Science*. 76:309-317.
- BEAUCHEMIN, K. A.; YANG, W. Z. 2005. Effects of physically effective fiber on intake, chewing activity, and ruminal acidosis for dairy cows fed diets based on corn silage. *Journal of Dairy Science*. 88:2117–2129.
- BERGMAN, N. R. 1990. Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. *Physiological Reviews*. 70 (2) pp 567-583.
- BLAS, C.; MATEOS, G.G.; GARCÍA-REBOLLAR, P. 2010. Tablas FEDNA de composición y valor nutritivo de alimentos para la fabricación de piensos compuestos. Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal. Madrid. España. [en línea] <http://fundacionfedna.org/subproductos_de_cereales> [7 febrero 2012].
- BOUCHER, S. E.; ORDWAY, R. S.; WHITEHOUSE, N. L.; LUNDY, F. P.; KONONOFF, P. J.; SCHWAB, C. G. 2007. Effect of incremental urea supplementation of a conventional corn silage-based diet on ruminal ammonia concentration and synthesis of microbial protein. *Journal of Dairy Science*. 90:5619–5633.

- BRAGACHINI, M.; PEIRETTI, J. 2008. Ganadería. En: BRAGACHINI, M.; CATTANI, P.; GALLARDO, M.; PEIRETTI, J. 2008. Forrajes conservados de alta calidad y aspectos relacionados al manejo nutricional. INTA EEA Manfredi. Córdoba. Argentina. Manual Técnico N° 6. 13 p.
- BRITO, A. F. ; BRODERICK, G. A. 2007. Effects of different protein supplements on milk production and nutrient utilization in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 90:1816–1827.
- BUTLER, C. A.; MOULD, F. L.; OWEN, E. 2001. Variation between feedstuff degradabilities assessed using short-term in vitro incubations and a comparison with in sacco derived values. *British Society of Animal Science*. UK. [en línea] <<http://www.bsas.org.uk/downloadsannlprocPdf2001153.pdf>> [Consulta: 13 de agosto de 2010].
- CALSAMIGLIA, S.; FERRET, A.; BACH, A. 2004. Tablas FEDNA de valor nutritivo de forrajes y subproductos fibrosos húmedos. Fundación para el desarrollo de la nutrición animal. Madrid. España. 70 p. [en línea] <http://fundacionfedna.org/subproductos_fibrosos_humedos/pulpa-de-c%C3%ADtricos> [7 febrero 2012].
- CALSAMIGLIA, S.; FERRET, A.; DEVANT, M. 2002. Effects of pH and pH Fluctuations on Microbial Fermentation and Nutrient Flow from a Dual-Flow Continuous Culture System. *Journal of Dairy Science*. 85:574–579.
- CALSAMIGLIA, S.; FERRET, A.; PLAIXATS, J.; DEVANT, M. 1999. Effect of pH and pH fluctuations on microbial fermentation in a continuous culture systems. *Journal of Dairy Science*. 82:38.
- CALSAMIGLIA, S.; CARDOZO, P. W.; FERRET, A.; BACH, A. 2008. Changes in rumen microbial fermentation are due to a combined effect of type of diet and pH. *Journal of Animal Science*. 86:702-711.
- CASSIDA, K. A.; STOKES, M. R. 1986. Eating and resting salivation in early lactation dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 69:1282–1292.
- CERRATO-SÁNCHEZ, M.; CALSAMIGLIA, S.; FERRET, A. 2007. Effects of Time at Suboptimal pH on Rumen Fermentation in a Dual-Flow Continuous Culture System. *Journal of Dairy Science*. 90:1486–1492.
- CHANEY, A. L.; MARBACH, E. P. 1962. Modified reagents for determination of urea and ammonia. *Clinical Chemistry*. 8:130-132.
- CHENG, K. J.; FAY, J.; HOWARTH, R. 1980. Sequence of events in the digestion of fresh legume leaves by rumen bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 40:613–619.
- CRAWFORD, R. J. JR.; HOOVER, W. H.; KNOWLTON, P. H. 1980. Effects of solids and liquid flows on fermentation in continuous cultures. I. Dry matter and fiber digestion, VFA production and protozoa numbers. *Journal of Animal Science*. 51:975-985.
- DEPETERS, E. J.; FADEL, J. G.; AROSEMENA, A. 1997. Digestion kinetics of neutral detergent fiber and chemical composition within some selected by-product feedstuffs. *Animal Feed Science and Technology*. 67:127- 140

- DESBORDES, C. K.; WELCH, J. G. 1984. Influence of specific gravity on rumination and passage of indigestible particles. *Journal of Animal Science*. 59:470-475
- DI MARCO, O. N. 2005. En calidad nutritiva de silaje de maíz y sorgo no está todo dicho. [en línea] <<http://anterior.inta.gob.ar/balcarce/info/documentos/ganaderia/bovinos/nutricion/calidad.htm>> [Consulta:23 de agosto 2010].
- EASTRIDGE, M. L. 2006. Major Advances in Applied Dairy Cattle Nutrition. *Journal of Dairy Science*. 89:1311–1323.
- ELLIS, J. L.; QIAO, F.; CANT, J. P. 2006. Prediction of dry matter intake throughout lactation in a dynamic model of dairy cow performance. *Journal of Dairy Science*. 89:1558–1570.
- FAHEY, G. C.; BERGER L. L. 1993. Carbohydrate nutrition of ruminant. En: Church, D. E. *The ruminant animal digestive physiology and nutrition*. Ed. Waveland, Illinois, United State of America. 90 p.
- FERNANDEZ, H. H. 1985. Efecto de la suplementación energética sobre la digestión de heno de agropiro. Tesis Magister Scientiae. Facultad de Ciencias Agrarias Universidad Nacional de Mar del Plata. Balcarce, Argentina. pp. 53-72.
- FERNANDEZ, H. H. 1990. Cinética de la digestión en ruminantes. Programas de computación. Versión 1. Factores que afectan el proceso de utilización ruminal y metabólica de forrajes tropicales, subtropicales y templados. Proyecto Pasto a Carne. Procisur. Juiz de Fora, Brasil.
- FERNANDEZ, I.; MARTIN, C.; CHAMPION, M.; MICHALET-DOREAU, B. 2003. Effect of corn hybrid and chop length of whole-plant corn silage on digestion and intake by dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 87:1298–1309.
- FIRKINS, J. L.; HRISTOV, A. N.; HALL, M. B.; VARGA, G. A.; ST-PIERRE, N. R. 2006. Integration of ruminal metabolism in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*. 89(E. Suppl.):E31–E51.
- FLIS, S. A.; WATTIAUX, M. A. 2005. Effects of parity and supply of rumen-degraded and undegraded protein on production and nitrogen balance in Holsteins. *Journal of Dairy Science*. 88:2096–2106.
- FRIGGENS, N. C.; OLDHAM, J. D.; DEWHURST R. J.; HORGAN, G. 1998. Proportions of volatile fatty acids in relation to the chemical composition of feeds based on grass silage. *Journal of Dairy Science*. 81:1331-1344.
- GAGGIOTTI, M. C.; COMERON, E.; ROMERO, L. A.; GALLARDO, M. 2008. Tabla de composición química de alimentos para rumiantes. INTA. Estación Experimental Agropecuaria Rafaela. Santa fe. Argentina.
- GARCIARENA, A. D.; HOFER, C. C. 1996. Malta húmeda. Subproductos de la industria cervecera. INTA. Estación Experimental Agropecuaria Concepción del Uruguay. Entre Ríos. Argentina. 5 p.
- GOERING, H. K.; VAN SOEST, P. J. 1970. Forage fiber analysis (apparatus, reagents, procedures and some applications). *Agricultural Handbook*. No. 379 ARS-USDA, Washington, DC.

- GRANT, R. J. ; WEIDNER, S. J. 1992. Digestion Kinetics of Fiber: Influence of In Vitro Buffer pH Varied Within Observed Physiological Range. *Journal of Dairy Science*. 75:1060-1068.
- GRANT, R. J. 1994. Influence of corn and sorghum starch on the in vitro kinetics of forage fiber digestion. *Journal Dairy Science*. 77:1563–1569.
- GRANT, R. J.; MERTENS, D. R. 1992 a. Influence of buffer pH and raw corn starch addition on in vitro fiber digestion kinetics. *Journal of Dairy Science*. 75:2762–2768.
- GRANT, R. J.; MERTENS, D. R. 1992 b. Buffers and pH effect on fiber digestion. *Journal of Dairy Science*. 75:1581-1587.
- GRANT, R. J.; MERTENS, D. R. 1992 c. Development of Buffer Systems for pH Control and Evaluation of pH Effects on Fiber Digestion In Vitro. *Journal of Dairy Science*. 75:1581-1587.
- GRESSLEY, T. F.; ARMENTANO, L. E. 2007. Effects of low rumen-degradable protein or abomasal fructan infusion on diet digestibility and urinary nitrogen excretion in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 90:1340–1353.
- GRISWOLD, K. E.; APGAR, G. A.; BOUTON, J.; FIRKINS, J. L. 2003. Effects of urea infusion and ruminal degradable protein concentration on microbial growth, digestibility, and fermentation in continuous cultura. *Journal of Animal Science*. 81:329-336.
- GROVUM, W. L.; WILLIAMS, V. J. 1973. Rate of passage of digesta in sheep. 4. Passage of marker through the alimentary tract and the biological relevance of rate-constants derived from the changes in concentration of marker in faeces. *British Journal of Nutrition*. 30:313-329.
- GUAITA, M. S.; FERNÁNDEZ, H. H. 2005. Tabla de composición química de alimentos para rumiantes. INTA. Estación experimental agropecuaria Balcarce. Buenos Aires. Argentina. 43 p.
- GUSTAFSSON, A. H.; PALMQUIST, D. L. 1993. Diurnal variation of rumen ammonia, serum urea, and milk urea in dairy cows at high and low yields. *Journal of Dairy Science*. 76:475-484.
- HALACHMI, I.; EDAN, Y.; MOALLEM, U.; MALTZ E. 2004. Predicting feed intake of the individual dairy cow. *Journal of Dairy Science*. 87:2254–2267.
- HOFFMAN, P. C.; LUNDBERG, K. M.; BAUMAN, L. M.; SHAVER, R. D. 2003. In vitro NDF digestibility of forages: The 30 vs. 48-hour debate. University of Wisconsin-Madison. Focus on Forage 5(16). <<http://www.uwex.edu/ces/crops/uwforage/30vs48-FOF.htm>> [Consulta:30 de agosto 2010].
- HOOVER, W. H.; CRAWFORD, R. J. JR.; STERN, M. D. 1982. Effects of solids and liquid flows on fermentation in continuous cultures, III. Solids retention time. *Journal of Animal Science*. 54:849-854.

- HOOVER, W. H.; KINCAID, C. R.; VARGA, G. A.; THAYNE, W. V.; JUNKINS L. L. JR. 1984. Effects of solids and liquid flows on fermentation in continuous cultures. IV. pH and dilution rate. *Journal of Animal Science*. 58: 692-699.
- HORNECK, D. A.; MILLER, R. O. 1998. Determination of total nitrogen in plant tissue. In Kalra, Y. P. ed. *Handbook of references methods for plant analysis*. Soil and Plant Analysis Council. CRC Press, Boca Raton, Florida, United State of America. 75-83.
- JOHNSON, L.M.; HARRISON, J.H.; DAVIDSON, D.; HUNT, C.; MAHANNA, W.C.; SHINNERS, K. 2003. Corn silage management: Effects of hybrid, maturity, chop length, and mechanical processing on rate and extent of digestion. *Journal of Dairy Science*. 86 (10). 3271-3299.
- KALSCHEUR, K. F.; BALWIN, R. L.; GLENN, B. P.; KOHN, R. A. 2006. Milk production of dairy cows fed differing concentrations of rumen-degraded protein. *Journal of Dairy Science*. 89:249–259.
- KANG-MEZNARICH, J. H.; BRODERICK, G. A. 1980. Effects of incremental urea supplementation on ruminal ammonia concentration and bacterial protein formation. *Journal of Animal Science*. 51:422-431.
- KAPS, M.; LAMBERSON, W. R. 2004. Repeated measures. En. Kaps, M.; Lamberson, W. R. *Biostatistics for animal science*. CABI Publishing, Trowbridge, United Kingdom. pp. 365-368.
- KASKE, M.; HATIBOGLU, S.; ENGELHARDT, W. 1992. The influence of density and size of particles on rumination and passage from the reticulo-rumen of sheep. *British Journal of Nutrition*. 67:235-244.
- KOMAREK, A. R.; ROBERTSON, J. B.; VAN SOEST, P. J. 1993. A comparison of methods for determining ADF using the filter bag technique versus conventional filtration. *Journal of Dairy Science*. 77 suppl 1 abstrac 250.
- KOMAREK, A. R.; ROBERTSON, J. B.; VAN SOEST, P. J. 1994. Comparison of the fiber bag technique the conventional filtration in the Van Soest NDF analysis of 21 feeds. *Proc. National conference on forage quality, evaluation and utilization*. Fahey G. C. Nebraska University, Nebraska, United States of America. pp 2.
- KRAJCARSKI-HUNT, H.; PLAIZIER, J. C.; WALTON, J.P.; SPRATT, R.; MCBRIDE, B. W. 2002. Short Communication: Effect of Subacute Ruminal Acidosis on In Situ Fiber Digestion in Lactating Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*. 85:570–573.
- LAHR, D. A.; OTTERBY, D. E.; JOHNSON, D. G.; LINN, J. G.; LUNDQUIST, R. G. 1983. Effects of moisture content of complete diets on feed intake and milk production by cows. *Journal of Dairy Science*. 66:1891-1900.
- MAEKAWA, M.; BEAUCHEMIN, K. A.; CHISTENSEN, D. A. 2002. Effect of concentrate level and feeding management on chewing activities, saliva production, and ruminal pH of lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 85:1165–1175.
- MAGYP. 2011 a. Superficie implantada. Sistema integrado de información agropecuaria. [en línea] <<http://www.siiia.gov.ar/index.php/series-por-tema/agricultura>> [Consulta: 23 Agosto 2011].

- MAGYP. 2011 b. Perfil de mercados de cítricos. [en línea] <http://www.minagri.gob.ar/new/0-0/programas/dma/frutas/perfil_c%C3%ADtricos_2011.pdf> [Consulta: 10 febrero 2012].
- MAGYP. 2012. Molienda. Sistema integrado de información agropecuaria. [en línea] <<http://www.sii.gov.ar/index.php/series-por-tema/agricultura>> [Consulta: 20 Enero 2012].
- Mc RAE, J. E.; AMSTRONG, D. G. 1968. Enzyme method for determination of alpha-linked glucose polymers in biological materials. *Journal Science Food Agriculture*. 19: 578.
- MCDONALD, I. 1981. A revised model for the estimation of protein degradability in the rumen. *Journal of Agricultural Science*. 96: 251-256.
- MEHREZ, A. R. ; ØRKOV, E. R. 1977. A study of the artificial fiber bag technique for determining the digestibility of feed in the rumen. *Journal of Agriculture Science Cambridge*. 88: 645-650.
- MEHREZ, A. Z. ; ØRSKOV, E. R.; MCDONALD, I. 1977. Rates of rumen fermentation in relation to ammonia concentration. *British Journal of Nutrition*. 38:437-443.
- MERCHEN, N. R. 1993. Digestion, absorption and excretion in ruminantes. En: Church, D. E. *The ruminante animal digestive physiology and nutrition*. Ed. Waveland, Illinois, United State of America. pp. 90.
- MERTENS, D. R. 1987. Predicting intake and digestibility using mathematical models of ruminal function. *Journal Animal Science*. 64:1548-1558.
- MERTENS, D. R. 1994. Regulation of forage intake. In: Fahey Jr., G.C., ed. *Forage Quality, Evaluation, and Utilization*. American Society Agronomy. Madison, Wisconsin. pp. 450-493.
- MERTENS, D. R. 1995. Comparing forage sources in dairy rations containing similar neutral detergent fiber concentrations. [en línea] <http://www.dfr.ars.usda.gov/RS95_pdfs/fu1.pdf> [Consulta: 22 Marzo 2012].
- MERTENS, D. R. 2010. NDF and DMI – has anything changed? [en línea] <<http://www.ansci.cornell.edu/cnconf2010/proceedings/CNC2010.18.Mertens.pdf>> [Consulta: 5 setiembre 2011].
- MILLER-CUSHON, E. K.; DEVRIES, T. J. 2009. Effect of dietary dry matter concentration on the sorting behavior of lactating dairy cows fed a total mixed ration. *Journal of Dairy Science*. 92:3292–3298.
- MOURIÑO, F.; AKKARAWONGSA, R.; WEIMER, P. J. 2001. Initial pH as a determinant of cellulose digestion rate by mixed ruminal microorganisms in vitro. *Journal of Dairy Science*. 84:848–859.
- NRC. 2001. *Nutrient Requirements of Dairy Cattle*. National academy press. Washitong, DC.
- OBA, M.; ALLEN, M. S. 1999. Evaluation of the importance of the digestibility of neutral detergent fiber from forage: Effects on dry matter intake and milk yield of dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 82:589–596.

- OBA, M.; ALLEN, M. S. 2003. Effects of corn grain conservation method on ruminal digestion kinetics for lactating dairy cows at two dietary starch concentrations. *Journal of Dairy Science*. 86:184–194.
- OBA, M.; ALLEN, M. S. 2005. In vitro digestibility of forages.[en línea] <<http://tristatedairy.osu.edu/Oba%20paper.pdf>> [Consulta: 17 Marzo 2012].
- OUELLET, D. R.; LAPIERRE, H.; CHIQUETTE, J. 2003. Effects of corn silage processing and amino acid supplementation on the performance of lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 86:3675–3684.
- PEA. 2010. Argentina líder agroalimentario. Ministerio de agricultura, ganadería y pesca. Buenos Aires. Argentina. [en línea] <<http://64.76.123.202/siteareasPEA224-Arentina%20Lider%20Agroalimentarioindex.php>> [consulta: 7 febrero 2010].
- PENNER, G. B.; BEAUCHEMIN, K. A. 2010. Variation among cows in their susceptibility to acidosis: Challenge or opportunity? *Advanced on Dairy Technology*. 22:173–187.
- PENNER, G. B.; TANIGUCHI, M.; GUAN, L. L.; BEAUCHEMIN, K. A.; OBA, M. 2009. Effect of dietary forage to concentrate ratio on volatile fatty acid absorption and the expression of genes related to volatile fatty acid absorption and metabolism in ruminal tissue. *Journal of Dairy Science*. 92:2767–2781.
- REYNOLDS, C. K.; KRISTENSEN, N. B. 2008. Nitrogen recycling through the gut and the nitrogen economy of ruminants: An asynchronous symbiosis. *Journal of Animal Science*. 86:E293-E305.
- ROBINSON, P. H.; BURGESS, P. L.; MCQUEEN, R. E. 1990. Influence of moisture content of mixed rations on feed intake and milk production of dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 73:2916-2921.
- ROSSI, R. M.; MARTINS, E. N.; GUEDES, T. A.; JOBIM, C. J. 2010. Bayesian analysis for comparison of nonlinear regression model parameters: an application to ruminal degradability data. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 39:419-424.
- RUSSELL, J. B.; WILSON, D. B. 1996. Why are ruminal cellulolytic bacteria unable to digest cellulose at low pH?. *Journal of Dairy Science*. 79:1503-1509.
- RUSSELL, J. B.; DOMBROWSKI, D. B. 1980. Effect of pH on the efficiency of growth by pure cultures of rumen bacteria in continuous culture. *Applied and Environmental Microbiology*. 39:604–610.
- SATTER, L. D.; BRINGE, A. N. 1969. Effect of abrupt ration changes on milk and blood components. *Journal of Dairy Science*. 52:1776-1780.
- SATTER, L. D.; SLYTER, L. L. 1974. Effect of ammonia concentration on rumen microbial protein production in vitro. *British journal nutrition*. 32:199–208.
- SAUVANT, D.; MESCHY, F.; MERTENS, D. 1999. Les composantes de l'acidose ruminale et les effets acidogenes des rations. *Productions Animales*. 12:49–60.
- SCHADT, I.; HOOVER, W. H.; MILLER-WEBSTER, T. K.; THAYNE, W. V., LICITRA, G. 1999. Degradation of two protein sources at three solids retention times in continuous culture. *Journal of Animal Science*. 77: 485-491.

- SENASA. 2011. Estratificación de establecimientos con existencias bovinas que declaran actividad de tambo. [en línea] <http://www.senasa.gov.ar/indicadores.php?d=7_Indicadores_Ganaderia_Bovina_de_Tambo&in=1> [Consulta: 25 agosto 2011].
- SUTTON, J. D.; DHANOA, M. S.; MORANT, S. V.; FRANCE, J.; NAPPER, D. J.; SCHULLER, E. 2003. Rates of production of acetate, propionate, and butyrate in the rumen of lactating dairy cows given normal and low-roughage diets. *Journal of Dairy Science*. 86:3620–3633.
- SWAIN, S. M.; ARMENTANO, L. E. 1994. Quantitative evaluation of fiber from nonforage sources used to replace alfalfa silage. *Journal of Dairy Science*. 77:2318-2331.
- TAGARI, H.; ARIELI, A.; MABJEESH, S.; BRUCKENTAL, I.; ZAMWELL, S.; AHARONI, Y. 1995. Assessment of duodenal amino acid profile in dairy cows by the in situ method. *Livestock Production Science*. 42: 13–22.
- TAYLOR, C. C.; ALLEN, M. S. 2005. Corn grain endosperm type and brown midrib 3 corn silage: site of digestion and ruminal digestion kinetics in lactating cows. *Journal of Dairy Science*. 88:1413–1424.
- TEIMOURI YANSARI, A.; VALIZADEH, R.; NASERIAN, A.; CHRISTENSEN, D. A.; YU, P.; EFTEKHARI SHAHROODI, F. 2004. Effects of alfalfa particle size and specific gravity on chewing activity, digestibility, and performance of holstein dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 87:3912–3924.
- TILLEY, J. M. A.; TERRY, R. A. 1963. A two-stage technique for the in vitro digestion of forage crops. *Journal of the British Grassland Society*. 18:104-111.
- TORREN, J.; JOHNSON, D. E.; KUJAWA, M. A. 1994. Co-product fiber digestibility: kinetic and in vivo assessment. *Journal Animal Science*. 72:790-795.
- TRUJILLO, A.I.; MARICHAL, M. DE J.; CARRIQUIRY, M. 2010. Comparison of dry matter and neutral detergent fibre degradation of fibrous feedstuffs as determined with in situ and in vitro gravimetric procedures. *Animal Feed Science and Technology*. 161: 49–57.
- UDEN, P.; COLUCCI, P. E.; VAN SOEST P. J. 1980. Investigation of chromium, cerium and cobalt as markers in digesta. Rate of passage studies. *Journal Science Food Agriculture*. 31:625-632.
- VAN KNEGSEL, A. T. M.; VAN DEN BRAND, H.; DIJKSTRA, J.; TAMMINGA, S.; KEMP, B. 2005. Effect of dietary energy source on energy balance, production, metabolic disorders and reproduction in lactating dairy cattle. *Reproduction Nutrition Development*. 45: 665–688.
- VAN SOEST, P. J. 1994 a. Forage evaluation technique. In: Van Soest, P.J. *Nutritional ecology of the ruminant*. Cornell university press. Ithaca, New York, United States of America. pp. 108-121.
- VAN SOEST, P. J. 1994 b. Intake. In: Van Soest, P.J. *Nutritional ecology of the ruminant*. Cornell university press. Ithaca, New York, United States of America. pp. 341.

- VAN SOEST, P. J. 1994 c. The ruminant forestomach. In: Van Soest, P.J. Nutritional ecology of the ruminant. Cornell university press. Ithaca, New York, United States of America. pp. 244.
- VAREL, V. H.; KREIKEMEIER, K. K. 1995. Technical note: Comparison of in vitro and in situ digestibility methods. *Journal Animal Science*. 73:578-582.
- WELCH, J. G. 1982. Rumination, particle size and passage from the rumen. *Journal of Animal Science*. 54:885-894.
- WIEMER, P. J. 1996. Why don't ruminal bacteria digest cellulose faster?. *Journal of Dairy Science*. 79:1496-1502.
- WEIMER, P. J.; STEVENSON, D. M.; MANTOVANI, H. C.; MAN S. L. C. 2010. Host specificity of the ruminal bacterial community in the dairy cow following near-total exchange of ruminal contents. *Journal of Dairy Science*. 93:5902–5912.
- YANG, W. Z.; BEAUCHEMIN, K. A. 2006. Increasing the physically effective fiber content of dairy cow diets may lower efficiency of feed use. *Journal of Dairy Science*. 89:2694–2704.
- YANG, W. Z.; BEAUCHEMIN, K. A.; RODE, L. M. 2002. Effects of particle size of alfalfa-based dairy cow diets on site and extent of digestion. *Journal of Dairy Science*. 85:1958–1968.
- YOUNKER, R. S.; WINLAND, S. D.; FIRKINS, J. L.; Hull, B. L. 1998. Effects of replacing forage fiber or non fiber carbohydrates with dried brewers grains. *Journal of Dairy Science*. 81:2645–2656.
- ZEBELI, Q.; DIJKSTRA, J.; TAJAJ, M.; STEINGASS, H.; AMETAJ, B. N.; DROCHNER, W. 2008. Modeling the adequacy of dietary fiber in dairy cows based on the responses of ruminal pH and milk fat production to composition of the diet. *Journal of Dairy Science*. 91:2046–2066.
- ZEBELI, Q.; TAJAJ, M.; WEBER, I; DIJKSTRA, J.; STEINGASS, H.; DROCHNER, W. 2007. Effects of varying dietary forage particle size in two concentrate levels on chewing activity, ruminal mat characteristics, and passage in dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 90:1929–1942.
- ZHANG, S. Z.; PENNER, G. B.; YANG, W. Z.; OBA, M. 2010. Effects of partially replacing barley silage or barley grain with dried distillers grains with solubles on rumen fermentation and milk production of lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 93:3231–3242.