

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE AGRONOMÍA**

**EFFECTO DEL USO DE ADITIVOS ALIMENTARIOS SOBRE
PARÁMETROS DE FERMENTACIÓN RUMINAL Y POBLACIÓN DE
PROTOZOARIOS EN VACAS LECHERAS**

por

**Anaclara DAUDET IRASTORZA
Tomás GARCÍA RODRÍGUEZ**

**Trabajo final de grado
presentado como uno de los
requisitos para obtener el
título de Ingeniero Agrónomo.**

**PAYSANDÚ
URUGUAY
2023**

Trabajo final de grado aprobado por:

Directores:

Ing. Agr. (MSc.) María de los Ángeles Bruni Borrone

Ing. Agr. (PhD) Diego Mattiauda Mele

Tribunal:

Ing. Agr. (PhD) Virginia Beretta Ramírez

Ing. Agr. (PhD) Ana Inés Trujillo Lezama

DMV (PhD) Alberto Casal Spera

Fecha: 22 de setiembre de 2023

Estudiantes:

Anaclara Daudet Irastorza

Tomás García Rodríguez

Agradecimientos

A todos los que formaron parte del proyecto. En primer lugar, a Magela y a Diego, nuestros tutores, por su dedicación y paciencia. A los funcionarios del tambo, del laboratorio y de la biblioteca de la EEMAC. A nuestras familias y amigos que nos apoyaron y acompañaron en estos años de formación. A todos ellos... Gracias.

Tabla de Contenido

Tabla de Contenido	Página
Hoja de Aprobación	2
Agradecimientos	3
Listas de Figuras y Tablas.....	6
Resumen.....	7
Summary	8
1. Introducción	9
1.1. Objetivos	10
1.1.1. Objetivo General	10
1.1.2. Objetivos Específicos.....	10
2. Revisión Bibliográfica	11
2.1. Sistemas de Producción de Leche de Uruguay	11
2.1.1. Desafíos Hacia el Futuro	11
2.1.2. Alimentación de la Vaca Lechera	12
2.2. Período de Transición de la Vaca Lechera.....	13
2.3. Fermentación Ruminal	15
2.3.1. Ambiente Ruminal	16
2.3.2. Microbiota Ruminal	17
2.3.3. Metabolismo de los Carbohidratos: Producción de Ácidos Grasos Volátiles	19
2.3.4. Metabolismo del Nitrógeno: Producción de Amoníaco	20
2.3.5. Modulación de la Fermentación Ruminal	24
2.4. Aditivos Alimentarios	25
2.4.1. Ionóforos	26
2.4.2. Efecto de la Monensina sobre los Parámetros Ruminales y la Población de Protozoarios.....	27
2.4.2.1. Efecto de la Monensina sobre el pH Ruminal.	29
2.4.2.2. Efecto de la Monensina sobre los AGV.	29
2.4.2.3. Efecto de la Monensina sobre la Concentración de N-amoniacal.	30
2.4.2.4. Efecto de la Monensina sobre la Población de Protozoarios Ruminales.	30
2.4.2.5. Síntesis de Resultados y Limitantes de la Monensina.....	30
2.4.3. Extractos de Plantas	31
2.4.3.1. Aceites Esenciales.	32
2.4.3.2. Compuestos Fenólicos.....	33
2.4.4. Efecto de los Extractos de Plantas sobre los Parámetros Ruminales y la Población de Protozoarios	34
2.4.4.1. Efecto de los Extractos de Plantas sobre el pH Ruminal.	36
2.4.4.2. Efecto de los Extractos de Plantas sobre los AGV.....	37
2.4.4.3. Efecto de los Extractos de Plantas sobre la Concentración de N-amoniacal.....	38
2.4.4.4. Efecto de los Extractos de Plantas sobre la Población de Protozoarios Ruminales.....	40

2.4.4.5. Síntesis de los Resultados y Limitantes los Extractos de Plantas.	41
2.5. Hipótesis.....	41
3. Materiales y Métodos.....	42
3.1. Localización y Período Experimental	42
3.2. Animales y Diseño Experimental.....	42
3.3. Tratamientos.....	42
3.4. Instalaciones y Rutina	42
3.5. Alimentación	43
3.5.1. Alimentación Preparto.....	43
3.5.2. Alimentación Posparto	44
3.6. Registros y Mediciones	46
3.6.1. pH Ruminal	46
3.6.2. Ácidos Grasos Volátiles	46
3.6.3. Nitrógeno Amoniacal	46
3.6.4. Protozoarios.....	47
3.7. Análisis Estadístico	48
4. Resultados	49
4.1. Preparto	49
4.1.1. pH Ruminal	49
4.1.2. Nitrógeno Amoniacal y Ácidos Grasos Volátiles	50
4.1.3. Protozoarios.....	50
4.2. Posparto.....	52
4.2.1. pH Ruminal	54
4.2.2. Nitrógeno Amoniacal	54
4.2.3. Ácidos Grasos Volátiles	56
4.2.3.1. AGV Totales.....	56
4.2.3.2. Ácido Acético.....	58
4.2.3.3. Ácido Propiónico.....	58
4.2.3.4. Ácido Butírico.	59
4.2.3.5. Relación C2/C3.	60
4.2.4. Protozoarios.....	61
5. Discusión.....	64
5.1. pH Ruminal	64
5.2. Nitrógeno Amoniacal	64
5.3. Ácidos Grasos Volátiles	66
5.4. Protozoarios.....	67
5.5. Períodos Preparto y Posparto	68
6. Conclusiones	70
7. Bibliografía	71
8. Apéndices.....	89

Listas de Figuras y Tablas

Figura No.		Página
1.	Curvas de producción de leche, consumo de materia seca y peso vivo e identificación del período de transición y déficit energético (BEN).....	14
2.	Metabolismo del Nitrógeno en los Rumiantes.....	22
3.	Materiales utilizados para realizar el conteo de protozoarios.....	47
4.	Dinámica diaria del pH ruminal durante el parto.....	50
5.	Población de protozoarios según tratamiento en el parto.....	51
6.	Dinámica diaria de la población de protozoarios durante el parto.....	51
7.	Dinámica del pH ruminal durante el parto.....	54
8.	N-amoniaco según tratamiento en el parto.....	55
9.	N-amoniaco según tratamiento en el parto.....	55
10.	Dinámica diaria del N-amoniaco durante el parto.....	56
11.	AGV totales según tratamiento en el parto.....	57
12.	Dinámica diaria de los AGVt durante el parto.....	57
13.	Dinámica diaria del ácido acético durante el parto.....	58
14.	Dinámica diaria del ácido propiónico durante el parto.....	59
15.	Porcentaje de ácido butírico según tratamiento en el parto.....	59
16.	Dinámica diaria del porcentaje de ácido butírico durante el parto.....	60
17.	Dinámica diaria de la relación acético/propiónico durante el parto.....	61
18.	Población de protozoarios según tratamiento durante el parto.....	61
19.	Población de protozoarios según tratamiento por período en el parto.....	62
20.	Dinámica diaria de la población de protozoarios durante el parto.....	63

Tabla No.

1.	Resumen de las características físicas y químicas del ecosistema ruminal.....	16
2.	Objetivos de la manipulación de la fermentación ruminal.....	25
3.	Resumen de estudios que describen la respuesta de los distintos parámetros ruminales y la población de protozoarios al uso de monensina.....	28
4.	Resumen de estudios in vivo que describen el efecto de los extractos de plantas en la fermentación ruminal y en la población de protozoarios.....	34
5.	Proporción de los alimentos de la RTM (base seca).....	43
6.	Proporción de ingredientes del concentrado parto (base seca).....	43
7.	Composición química de la RTM para cada tratamiento (base seca) durante el parto.....	44
8.	Composición química de la alfalfa (base seca).....	45
9.	Proporción de los alimentos de la RTM (base seca) durante el parto.....	45
10.	Composición de los alimentos del concentrado parto (base seca).....	45
11.	Composición química de la RTM para cada tratamiento (base seca).....	46
12.	Efecto de la adición de monensina y extractos de plantas sobre parámetros ruminales y población de protozoarios durante el parto.....	49
13.	Parámetros ruminales y población de protozoarios durante el parto.....	53

Resumen

La necesidad de cumplir con las demandas de los mercados internacionales y de garantizar prácticas de producción sostenibles destacan el desafío de mejorar la fermentación ruminal. El uso de antibióticos, como la monensina, lo ha logrado, pero la posible generación de resistencia genera preocupación y se han buscado alternativas como son los extractos de plantas. El objetivo de esta investigación fue evaluar el impacto de la monensina y de una mezcla de extractos de plantas en la fermentación ruminal de vacas lecheras durante el período de transición e inicio de lactancia en sistemas pastoriles mixtos. En un diseño completamente al azar con medidas repetidas en el tiempo, se asignaron 9 vacas Holando fistuladas, a uno de tres tratamientos: monensina (MON; 300mg/animal/día), extractos de plantas (EXP; 50g/animal/día) conteniendo trans-cinamaldehído, flavonoides, curcuminoides y piperina, y un tratamiento control (CON) sin agregados de aditivos. Treinta días antes de la fecha probable de parto, los animales ingresaron al preparto, siendo estabulados en un sistema de “compost barn”, consumiendo ración totalmente mezclada (TMR) que incluía el aditivo en el concentrado, según correspondiera el tratamiento. Luego del parto se manejaron en un sistema de alimentación mixto, con una sesión de pastoreo entre los ordeñes (05:00 y 16:00hs) y encierro luego del ordeño pm. Se tomaron muestras de líquido ruminal a los -11, +33 y +63 días relativos a la fecha promedio de parto para determinar el pH, nitrógeno amoniacal (N-amoniacal), ácidos grasos volátiles totales (AGVt), acético (C2), propiónico (C3), butírico (C4) y población de protozoarios. Los muestreos se realizaron en dos días consecutivos, a las 0, 4, 8, 16, 24 hs post-alimentación. En el preparto, la concentración de pH ruminal, N-amoniacal, AGVt, C2, C3, C4 y la relación C2/C3 no fueron afectados por los tratamientos; sin embargo, la población de protozoarios fue significativamente menor en los tratamientos MON y EXP con relación al CON ($p=0,008$). En el posparto, la concentración de N-amoniacal y de C4 fueron significativamente menores en el tratamiento EXP con relación a los grupos MON y CON ($p<,0001$ y $p=0,0001$, respectivamente), y la población de protozoarios fue menor en los tratamientos MON y EXP respecto al CON ($p<0,0001$). Se concluye que los aditivos alimentarios pueden ser una estrategia para mejorar la fermentación ruminal en vacas lecheras durante el período de transición e inicio de lactancia en sistemas pastoriles mixtos. Sin embargo, se necesita más investigación sobre su capacidad de modular la microbiota ruminal. Un conocimiento más profundo del uso de aditivos en vacas lecheras en transición en sistemas mixtos será útil para lograr un aumento de la eficiencia de producción de los sistemas de producción de leche de Uruguay.

Palabras clave: vaca lechera, fermentación ruminal, monensina, extractos de plantas

Summary

The need to meet the demands of international markets and to ensure sustainable production practices underscore the challenge of improving rumen fermentation. The use of antibiotics, such as monensin, has achieved this goal, but concerns about the potential development of resistance are prompting research into alternatives such as plant extracts. The aim of this research was to assess the impact of monensin and a blend of plant extracts on ruminal fermentation in dairy cows during the transition and early lactation period within mixed grazing systems. Employing a completely randomized design with repeated measures over time, nine fistulated Holstein cows were allocated to one of three treatments: monensin (MON; 300 mg/animal/day), plant extracts (EXP; 50 g/animal/day) containing trans-cinnamaldehyde, flavonoids, curcuminoids, and piperine, and a control treatment (CON) devoid of additive supplementation. Thirty days prior to the anticipated calving date, the animals entered the prepartum phase, being housed in a compost barn system and consuming a total mixed ration (TMR) that incorporated the additive in the concentrate, as per the respective treatment. Following calving, they were managed within a mixed feeding system, undergoing a grazing session between milkings (05:00 and 16:00 hrs) and confinement post-evening milking. Ruminal fluid samples were collected at -11, +33, and +63 days relative to the average calving date to assess pH, ammonia nitrogen (N-ammoniacal), total volatile fatty acids (AGVt), acetic (C2), propionic (C3), butyric (C4) acids, and protozoa population. Sampling was conducted over two consecutive days at 0, 4, 8, 16, and 24 hrs post-feeding. During the prepartum period, ruminal pH concentration, N-ammoniacal, AGVt, C2, C3, C4, and C2/C3 ratio were unaffected by the treatments; however, the protozoa population was significantly lower in the MON and EXP treatments in comparison to CON ($p=0.008$). In the postpartum phase, N-ammoniacal and C4 concentrations were significantly lower in the EXP treatment relative to MON and CON groups ($p<0.0001$ and $p=0.0001$, respectively), and the protozoa population was lower in the MON and EXP treatments compared to CON ($p<0.0001$). In conclusion, feed additives constitute a strategy to improve rumen fermentation in dairy cows during transition and early lactation in mixed grazing systems. However, further research into their potential to modulate the rumen microbiota is warranted. A more comprehensive understanding of the use of additives in transitioning dairy cows in mixed systems will prove valuable in increasing the production efficiency of dairy production systems in Uruguay.

Keywords: dairy cow, rumen fermentation, monensin, plant extracts

1. Introducción

La producción de leche es una actividad estratégica para el desarrollo del Uruguay por su valor económico y social. En el año 2021 las exportaciones de lácteos representaron el 8% de las exportaciones del país generando más de 11.000 puestos de trabajo, contribuyendo a poblar y dinamizar el interior del país (Centro de Estudios de la Realidad Económica y Social [CERES], 2021).

El principal destino de la producción de lácteos en Uruguay es la comercialización en los mercados internacionales. Según el Instituto Nacional de la Leche (INALE, 2021) el 71% de la producción se exporta a más de 60 mercados. Esta condición determina que se deban atender las demandas de los consumidores, manteniendo un equilibrio entre la producción, cuidado ambiental, promoción social y bienestar animal. Por lo tanto, el desafío hacia el futuro está en lograr que los procesos de intensificación se basen en los pilares de competitividad y sostenibilidad.

Una de las limitantes para alcanzar dichos objetivos son las ineficiencias asociadas a la fermentación ruminal. En este proceso ocurren pérdidas energéticas y de nitrógeno entre otros que reducen la producción y tienen consecuencias ambientales. Si se logra una mejora en la eficiencia ruminal se puede obtener un beneficio económico, social y ambiental que aportaría al desarrollo del sector.

En búsqueda de reducir estas pérdidas, en la década de 1970 surgió la incorporación de antibióticos ionóforos como aditivos en la dieta de los rumiantes (Newbold, 2017). La monensina es el antibiótico más utilizado con estos fines. Este ionóforo genera una modificación de la microbiota ruminal que permite mejorar la eficiencia de utilización del alimento (Rezaei Ahvanooei et al., 2023) y reducir la contaminación ambiental en términos de emisiones de amoníaco, óxido nitroso y metano (Tedeschi et al., 2003). Sin embargo, el uso generalizado de antibióticos por razones de producción en el ganado lechero está bajo un escrutinio cada vez mayor debido a las preocupaciones sobre la resistencia a los antibióticos (Newbold, 2017). Por esta razón, se desarrollaron diferentes alternativas al uso de antibióticos, entre ellas la utilización de extractos de plantas como modificadores de la microbiota ruminal. Los mismos se estudiaron principalmente en sistemas confinados, por lo que surge el interés de conocer su efecto en condiciones pastoriles asociados a nuestros sistemas productivos lecheros.

Este trabajo se desarrolla con el fin de determinar el impacto del uso de aditivos como moduladores de la fermentación ruminal en vacas lecheras durante el período de transición e inicio de lactancia en sistemas pastoriles mixtos.

1.1. Objetivos

1.1.1. Objetivo General

El objetivo de este trabajo es determinar el impacto de la incorporación de dos aditivos, monensina y extractos de plantas, como moduladores de la fermentación ruminal en vacas lecheras durante el período de transición e inicio de lactancia en sistemas pastoriles mixtos.

1.1.2. Objetivos Específicos

Como objetivos específicos se plantea: i) evaluar el efecto del uso de monensina y extractos de plantas sobre los parámetros ruminales (pH, ácidos grasos volátiles: AGV y nitrógeno amoniacal: N-amoniacal) y población de protozoarios a lo largo del día. ii) evaluar si existen efectos diferenciales por el uso de monensina o extractos de plantas sobre los parámetros ruminales (pH, AGV y N-amoniacal) y población de protozoarios según la etapa fisiológica de los animales.

2. Revisión Bibliográfica

2.1. Sistemas de Producción de Leche de Uruguay

2.1.1. *Desafíos Hacia el Futuro*

Las proyecciones de crecimiento de la población mundial, junto al aumento del consumo per cápita de productos lácteos de los países en desarrollo, determinan un incremento previsto de la demanda de leche (Alexandratos & Bruinsma, 2012). Según Huws et al. (2018) para atender a esta demanda los esfuerzos deben centrarse en el aumento de la eficiencia de producción de los sistemas de producción. Además, a medida que crece la demanda de alimentos los consumidores quieren conocer más sobre el sistema de producción tanto en términos de impacto ambiental como de bienestar animal (Delaby et al., 2020). Por este motivo, los sistemas de producción del Uruguay tienen el desafío de aumentar la eficiencia del sistema y a su vez responder a demandas de la sociedad.

Desde el año 1985, en el Uruguay se dio un proceso de crecimiento productivo de la lechería que se basó en un aumento de carga animal y fundamentalmente en una mayor producción individual (Fariña & Chilibróste, 2019). Chilibróste (2015) indica que los sistemas más intensivos de producción son los que cosechan más forraje por hectárea, pero a su vez requieren mayores niveles de suplementación para manejar los desequilibrios entre la oferta y demanda de pasturas. Es decir que el crecimiento productivo no se basó únicamente en mejoras de la eficiencia del sistema.

Los sistemas de producción eficientes son aquellos que buscan reducir las fugas de energía en cada fase de su utilización por medio del control tecnológico de las variables en juego (Viglizzo, 1981). El modelo teórico elaborado por Viglizzo (1981; ver el Apéndice A) permite contextualizar el tema de estudio del presente trabajo dentro del sistema de producción de leche. Las pérdidas de energía que se generan durante los procesos de transferencia energética en un sistema pastoril se pueden simplificar en cuatro componentes: pérdidas por captación ineficiente de la radiación solar; pérdidas por utilización ineficiente del forraje; pérdidas por ineficiencia digestiva y metabólica del rumiante; y pérdidas por gastos improductivos del rodeo.

Las tecnologías tendientes a aumentar la producción y cosecha de forraje serán las que generen un mayor impacto en la mejora de la eficiencia del sistema por reducir las primeras dos pérdidas mencionadas. Las mejoras en el diseño de las rotaciones y la optimización del manejo de las pasturas permiten una mayor captación de la radiación solar que determina un importante incremento en la producción de forraje del sistema. A su vez, el incremento de la carga animal y la confección de reservas forrajeras permiten el aumento de la cosecha de forraje.

Las pérdidas por ineficiencias digestivas y metabólicas de los rumiantes quedan definidas por las pérdidas en heces, orina, gases y el incremento calórico (McDonald et al., 2022). Además de la importancia por la pérdida de energía, estas pérdidas generan un gran impacto social y ambiental. Por lo tanto, la modulación de la fermentación ruminal es una herramienta que podría contribuir a una mejora en la eficiencia del sistema y a dar respuestas a las demandas de la sociedad. Los aditivos alimentarios permiten modular la fermentación ruminal y han sido evaluados en numerosos experimentos en sistemas confinados. Por este motivo surge el interés de su estudio en sistemas pastoriles como los de Uruguay.

2.1.2. Alimentación de la Vaca Lechera

Las condiciones edafoclimáticas del Uruguay permiten la producción de pasturas templadas de alta calidad a un bajo costo de producción (Cajarville et al., 2012). Los sistemas pastoriles ofrecen ventajas como: menor impacto ambiental debido a una menor emisión neta de gases de efecto invernadero y una menor erosión del suelo (Perry, 2011); menor incidencia de enfermedades como dermatitis digital y mastitis (Rushen et al., 2008); y características de la leche más beneficiosas para la salud humana por menor relación de ácidos grasos saturados:poliinsaturados y mayores niveles de ácido linoleico conjugado (CLA; Lourenço et al., 2008).

El proceso de crecimiento productivo de la lechería en Uruguay tuvo su correlato en la alimentación de los animales tanto en la composición de las dietas como en el sistema de alimentación. En cuanto a la composición, se dio un aumento en la utilización de reservas forrajeras y concentrados (Cajarville et al., 2012). Este cambio responde, por un lado, a los bajos consumos de materia seca y por lo tanto de energía, logrados con las pasturas (Kolver & Muller, 1998); y por otro, a las grandes fluctuaciones en la disponibilidad de forraje que se dan a lo largo del año (Aguerre et al., 2019). En cuanto a los sistemas de alimentación, los productores han manejado diferentes alternativas: a) pastoreo, concentrados y reservas por separado; b) pastoreo directo y el resto de los alimentos (ensilaje, heno y concentrado) en forma de ración totalmente mezclada (RTM) y c) encierre de animales y suministro de RTM (Cajarville et al., 2012). No obstante, según Fariña y Chilbroste (2019), los sistemas productivos en nuestro país se caracterizan por una alimentación compuesta aproximadamente por 55% forraje cosechado directamente por el animal, 19% cosechado mecánicamente y 26% concentrados, siendo más del 75% de la dieta, parte de la producción primaria del predio.

La combinación de pastoreo con RTM podría tener efectos benéficos sobre la fermentación ruminal y sobre el bienestar animal. Bargo et al. (2002) mencionan que esta estrategia podría determinar; por un lado, un pH ruminal más alto y con mayor estabilidad y por otro, una reducción del amoníaco ruminal por el agregado de fuentes de forraje con mayor fibra efectiva y menor contenido de proteína, en relación con una dieta basada en pastoreo suplementada con concentrado. Estos autores compararon los sistemas e indican que la concentración de amoníaco en el

rumen fue menor con RTM y con combinación de pasturas con RTM respecto a pasturas y concentrado, pero no detectaron diferencias en el pH ni en la concentración y perfil de AGV. Además, esta estrategia podría reducir algunos problemas de bienestar animal asociados a sistemas exclusivamente pastoriles, como la exposición al frío y al calor extremo, al viento y a la lluvia (Rushen et al., 2008) y a una menor presencia de barro que aporta tanto al bienestar animal como a la calidad de vida de los trabajadores.

Debido a la importancia que tiene el período de transición puede que sea conveniente mantener al rodeo en un ambiente con buen confort y dietas balanceadas según los requerimientos, con el objetivo de atenuar lo máximo posible la brecha entre oferta y demanda energética (Mackinnon et al., 2020). En este sentido, en el presente trabajo de investigación, se manejó un sistema de encierre en establo con una dieta total mezclada en el parto y un sistema mixto de pastoreo con una ración totalmente mezclada en el encierre vespertino durante el posparto (ver sección 3.5).

2.2. Período de Transición de la Vaca Lechera

El período de transición transcurre entre las tres semanas parto y tres semanas posparto (Drackley, 1999) y se define como una etapa de cambios drásticos para el animal (Meikle et al., 2013). Los cambios endócrinos que ocurren para soportar el parto y la lactogénesis influyen altamente en la utilización de nutrientes y el metabolismo de los tejidos (Grummer, 1995), lo que resulta en desórdenes metabólicos y problemas infecciosos en proporciones exageradas en relación con el corto período mencionado (Drackley, 1999). A su vez, el sistema inmune se ve deprimido como consecuencia de la pérdida de capacidad de homeorresis, lo que acentúa aún más la incidencia de patologías infecciosas (Sepúlveda & Wittwer, 2017).

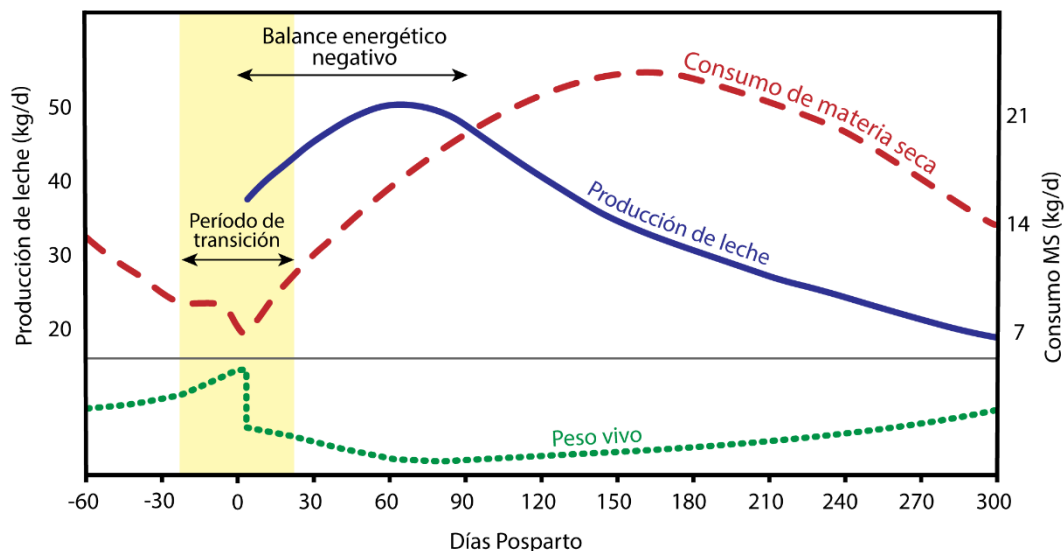
Durante este período, la vaca debe ser capaz de adaptar su metabolismo al fuerte aumento de los requerimientos por las altas exigencias de la lactancia que, a su vez, superan ampliamente el suministro de nutrientes debido a una disminución del consumo (Drackley, 1999). Esta baja en el consumo puede llegar a un 30% en la semana previa al parto, mientras que los requerimientos crecen exponencialmente (Sepúlveda & Wittwer, 2017).

El desfasaje entre las curvas de consumo y de producción de leche, genera un balance energético negativo (BEN) que obliga a la vaca a movilizar sus reservas corporales (Grummer, 1995) con la consecuente pérdida de peso vivo (PV) y condición corporal (CC; figura 1). La alta movilización de tejido adiposo se identifica por el aumento de las concentraciones sanguíneas de ácidos grasos no esterificados (AGNE; Drackley, 1999) que, en general, es seguido por un aumento del betahidroxibutirato (BHB) que indica un déficit energético (Meikle et al., 2013). Los indicadores de BEN están altamente correlacionados con la pérdida de

producción de leche, aumento en la incidencia de enfermedades y disminución de la fertilidad (Cardoso et al., 2020).

Figura 1

Curvas de producción de leche, consumo de materia seca y peso vivo e identificación del período de transición y déficit energético (BEN)



Nota. Adaptado de Ammum (2019).

La CC al momento del parto y los cambios que ocurren luego del mismo por la movilización de reservas están asociados a la performance productiva, reproductiva y salud de la vaca; lo ideal es que se llegue al parto con 3 a 3,5 puntos, en la escala de 5 puntos (Roche et al., 2009). Por este motivo es importante monitorear la CC durante la fase de recuperación de reservas y en el período de transición.

El BEN es una etapa inevitable en las vacas lecheras, principalmente las de alta producción. Sin embargo, la extensión de este período y el nadir (momento donde se alcanza el máximo BEN) son variables y son determinantes para la recuperación del animal (Ninabanda, 2018). En casos donde el consumo disminuye excesivamente, ya sea por factores ambientales, nutricionales o de manejo, se altera fuertemente la respuesta inmunitaria del animal, profundizándose la aparición de las patologías recurrentes en esta etapa (Baeck, 2012).

Por esta razón, es necesario realizar un manejo adecuado a las necesidades fisiológicas de los animales. Uno de los principales focos para minimizar el estrés durante el período de transición es el manejo nutricional, buscando maximizar el consumo de energía y reducir la movilización del tejido adiposo (Grummer, 1995).

En un manejo ideal, las vacas lecheras son secadas a los 7 meses de gestación y al inicio de este período son alimentadas con una dieta con mayor proporción de forraje (dieta de menor densidad energética) y fibra detergente neutro (FDN; Goff & Horst, 1997). En este momento, existen cambios en la flora ruminal (predominantemente de amilolítica a celololítica), producción de AGV (mayor

producción de acetato), menor superficie de las papilas ruminales y, como consecuencia, menor área de absorción (Sepúlveda & Wittwer, 2017). Luego del parto las demandas de la glándula mamaria serán muy altas y el consumo será menor; por lo tanto, la dieta deberá tener una alta densidad energética, lo que estimulará el consumo de materia seca y mejorará la performance posparto (Grummer, 1995). Sin embargo, es necesario que el animal logre adaptarse a la misma. Por este motivo es indispensable un período de adaptación para la introducción de concentrados a la dieta al menos 3 semanas previas al parto, para lograr la estabilización del pH ruminal (Dirksen et al., 1985) y la adaptación de la microflora ruminal a dietas con mayor contenido de almidón.

Durante la lactancia temprana la síntesis de lactosa por la glándula mamaria se ve limitada por una baja absorción directa de glucosa, lo que también condiciona al mismo animal, ya que este monosacárido es la principal fuente de energía para sus funciones (Saha & Pathak, 2021). La gluconeogénesis es un proceso fundamental para apoyar la homeostasis de glucosa; el suministro de precursores glucogénicos y la dinámica del glucógeno hepático suelen ser suficientes para cubrir las necesidades de producción de glucosa hepática en condiciones normales (Aschenbach et al., 2010). Sin embargo, durante la transición, la deficiencia es inevitable y las vacas se ven obligadas a movilizar sustratos glucogénicos endógenos y a aumentar la expresión hepática de la enzima piruvato carboxilasa, quien proporciona oxalacetato para la gluconeogénesis (Cáceres, 2019). Aun así, existen estrategias de manejo que buscan hacerle frente a la alta demanda, como puede ser i): una dieta con alta proporción de concentrados que logrará aumentar el suministro de precursores glucogénicos (principalmente propionato) exógenos a través de un aumento en la fermentación ruminal producto de una mayor oferta de almidón. ii): modulación de la fermentación ruminal hacia una mayor producción de propionato, logrado, por ejemplo, con la inclusión de aditivos ionóforos (Aschenbach et al., 2010).

La presión metabólica dada por los altos niveles de producción potenciales y su desfasaje con la capacidad de consumo desafían al sistema lechero por el aumento de la incidencia de enfermedades (Meikle et al., 2013). La magnitud de los cambios que sufre el animal durante este período juega un rol fundamental en determinar el estrés que experimente, y con esto, la capacidad de producir leche, evitar enfermedades metabólicas y asegurar la siguiente preñez (Grummer, 1995).

2.3. Fermentación Ruminal

Los rumiantes tienen la ventaja ecológica de tener una simbiosis con su microbiota ruminal que les permite convertir la biomasa vegetal en proteína celular microbiana y ácidos grasos volátiles. Las adaptaciones anatómicas de su sistema digestivo permiten que ocurra una fermentación microbiana de los alimentos previa a la actividad digestiva gástrica e intestinal (Niwiska, 2012). Por este motivo tienen la capacidad de explotar fuentes de alimentos fibrosos que contienen celulosa, el carbohidrato más abundante del mundo, y otros componentes. Esta especialización

respecto a la estrategia nutricional es el resultado de la adaptación evolutiva en respuesta a un conjunto particular de circunstancias ecológicas (Van Soest, 1994).

Louis Pasteur definió la fermentación como “la vida sin aire” (Behera et al., 2019), refiriéndose al metabolismo anaeróbico que realizan los microorganismos con el fin de obtener energía para cubrir sus requerimientos. A efectos prácticos, los carbohidratos son los únicos nutrientes que se pueden fermentar para producir cantidades significativas de adenosín trifosfato (ATP), la principal fuente de energía de los sistemas biológicos (Webster, 2020). La fermentación puede definirse como una oxidación incompleta donde los aceptores finales de electrones son compuestos de carbono formados en el propio proceso (Naas & Pope, 2020).

2.3.1. Ambiente Ruminal

La adaptación evolutiva de los rumiantes permite el desarrollo de una microbiota ruminal que es capaz de suministrar energía y proteína de alta calidad. Los rumiantes se encargan de suministrar nutrientes al rumen en forma continua, manteniendo niveles de 10 a 18% de materia seca, que son utilizados por los microorganismos que lograron adaptarse a las características físicas del ambiente ruminal. Estas características son: pH entre cercano a neutro, dadas las constantes secreciones salivales que, por efecto del bicarbonato y fosfato, generan un efecto buffer sobre la acidez producida por la fermentación; potencial de óxido – reducción entre -350 y -450 mV que determina condiciones de reducción y por lo tanto de anaerobiosis; presión osmótica entre 250 y 350 mOsmol/kg que determina que el flujo neto de agua que entra y sale del rumen sea próximo a cero (Mackie et al., 2001; Yokoyama & Johnson, 1988) como se muestra en la tabla 1.

Tabla 1

Resumen de las características físicas y químicas del ecosistema ruminal

Característica	Propiedad	Fuente
Físicas		(Mackie et al., 2001)
pH	5,5 a 6,9 (media: 6,4)	
Potencial redox	-350 a -400 mV	
Temperatura	38 a 41 °C	
Presión osmótica	250 a 350 mOsmol/kg	
Materia seca	10 a 18%	
Químicas		
Fase gaseosa (%)	CO ₂ , 65; CH ₄ , 27; N ₂ , 7; O ₂ , 0,6; H ₂ , 0.2	(Yokoyama & Johnson, 1988)
AGV totales	90 a 151 mmol/l (media: 121 mmol/l)	
AGV (%)	Acetato 42 - 69	(Bargo et al., 2003)
	Propionato 19 - 25	
	Butirato 10 - 14	
N-amoniacal	87 a 322 mg/l (media: 183 mg/l)	(Bargo et al., 2003)

Nota. Los valores entre paréntesis indican la media. Los valores de AGV totales y N-amoniacal corresponden a vacas lecheras en pastoreo con suplementación (1,1 a 10 kgMS/d).

2.3.2. Microbiota Ruminal

Las características del ambiente ruminal confieren un hábitat ideal para la sobrevivencia y crecimiento de diversos microorganismos. La población microbiana del rumen incluye miembros que pertenecen a los tres Dominios: Eubacteria (bacterias), Archaea (metanógenos) y Eukarya (protozoarios y hongos) (Nagaraja, 2016). Esta notable diversidad define dos propiedades ecológicas de la comunidad microbiana del rumen: la redundancia (superposición de funciones entre múltiples especies) y la resiliencia (resistencia a las perturbaciones y capacidad para recuperarse de ellas). Estas propiedades proporcionan una gran estabilidad que mantiene la función digestiva en diversas condiciones de alimentación y manejo y a su vez generan una limitante para mejorar la función ruminal (Weimer, 2015).

El número de bacterias que viven en el rumen oscila entre 10^9 y 10^{11} células/mL de contenido ruminal (Huws et al., 2020) y varía según la digestibilidad del alimento, ya que con dietas basadas en granos la población es entre 10 a 100 veces mayor que con dietas basadas en forraje (Nagaraja, 2016). El tipo de sustratos que atacan, y por ende los distintos productos finales de fermentación, es una de las maneras más difundidas de clasificación, reconociéndose hasta 8 grupos: bacterias celulolíticas, amilolíticas, hemicelulolíticas y pectinolíticas, proteolíticas, entre otras (Yokoyama & Johnson, 1988). Sin embargo, existen muchas formas de clasificarlas, pudiendo diferenciarlas también por su estructura: grampositiva (20-30% del total) y gramnegativa (80-90% del total), forma, tamaño, distribución: libres (30% del total) o adheridas (70% del total), metabolismo (anaerobias o facultativas) y, más recientemente, mediante análisis genéticos (Nagaraja, 2016).

Los protozoarios del rumen son el segundo grupo de microorganismos (por masa) más abundante en el rumen (Williams & Coleman, 1992). Son de un tamaño mucho mayor al de las bacterias (5 a 250 μm vs. 0,3 a 50 μm ; (Williams & Coleman, 1992; Yokoyama & Johnson, 1988) por lo que, a pesar de oscilar entre 10^4 y 10^6 células/mL contenido ruminal (Huws et al., 2020), pueden llegar a conformar hasta el 50% de la biomasa ruminal (Russell, 2002). Se diferencian de las bacterias por tener una menor capacidad celulolítica y ser incapaces de sintetizar proteínas a partir de NNP (Giuliodori et al., 2013).

Los protozoarios ruminales desarrollaron estrategias para sobrevivir en el rumen debido a que tienen un lento tiempo de generación (entre 5 a 16 horas aproximadamente) y una alta tasa de flujo (2×10^{11} cel./día aproximadamente). Por ejemplo, se adhieren a las partículas de alimento y a la pared ruminal para evitar la salida del rumen (Huws et al., 2020).

Los protozoarios son anaerobios estrictos y muy sensibles a los cambios de la dieta, aumentando al incluir dietas ricas en azúcares y almidón de alta digestibilidad (Contreras & Noro, 2010). Sin embargo, son incapaces de sobrevivir en un medio muy ácido, por lo que con dietas altamente concentradas no están presentes en el rumen (Saha & Pathak, 2021). Se pueden clasificar en ciliados y flagelados, pero estos últimos son los de menor tamaño, número e importancia, ya

que realizan una contribución insignificante en la fermentación ruminal (Nagaraja, 2016). Por lo tanto, los protozoarios ciliados son los más abundantes y de mayor importancia, siendo los holotricos (orden: Vestibuliderida) y entodiniomorfos (orden: Entodiniomorphida) los más comunes (Williams & Coleman, 1992). Ambos utilizan su cilia para su locomoción y para llevar alimento, bacterias y protozoarios más pequeños a su boca; sin embargo, se diferencian en la distribución de estas, siendo que los primeros tienen ciliadas en todo su cuerpo, mientras que los últimos sólo en regiones puntuales, como ciliadas orales y algunos en el dorso (Russell, 2002).

Los protozoarios favorecen al rumiante aumentando el valor biológico de la proteína (Giuliodori et al., 2013) porque son capaces de sintetizar aminoácidos, pero esta síntesis no es suficiente para cubrir sus requerimientos. Por este motivo, necesitan de la digestión de bacterias, hongos, proteínas vegetales y aminoácidos libres ingeridos por el animal (Leguizamón & Carreño, 2013). En animales alimentados con dietas bajas en proteína, la eliminación de los protozoarios (defaunación) puede aumentar el suministro de esta; al incrementar la síntesis de proteína microbiana por un mayor número de bacterias y una menor degradación, aumenta el flujo proteico hacia el intestino (Nagaraja, 2016) y disminuye la concentración ruminal de amoníaco (Giuliodori et al., 2013). Sin embargo, tienen un rol beneficioso en dietas basadas en granos, ya que envuelven al almidón disminuyendo la tasa de fermentación, además de controlar el número de bacterias, logrando así regular el pH y proteger al animal de la ocurrencia de acidosis (Russell, 2002), lo que resulta en una fermentación más estable.

En respuesta a la alimentación, la población de entodiniomorfos disminuye en más de un 50% en las 6 horas posteriores a la alimentación, tras lo cual la población vuelve a aumentar en 24 horas hasta alcanzar los niveles anteriores a la alimentación. Se cree que esto se debe a una mayor cantidad de saliva y agua que entra en el rumen y diluye los microorganismos; además, podría deberse al pasaje de fluido ruminal con protozoarios al omaso. El incremento de la población antes y durante la alimentación podría ser por una división de los protozoarios y por una redistribución de los protozoarios en el rumen debido a las contracciones del retículo-rumen asociadas a la rutina de alimentación (Williams & Coleman, 1992).

Los protozoarios son responsables de las etapas iniciales de la colonización y digestión de la fibra. Por esta razón, la defaunación se ha asociado a disminuciones de la degradación de la materia orgánica (Newbold et al., 2015). En estos casos, aunque la defaunación incrementa la eficiencia de la síntesis de proteína microbiana, la síntesis de proteína microbiana no necesariamente se incrementa (Jouany et al., 1988).

Otro resultado de la defaunación es el aumento del flujo de proteína microbiana al duodeno por menor depredación de bacterias que da lugar a mayor biomasa bacteriana (Huws et al., 2020). Debido a su relación simbiótica con los metanógenos, la defaunación podría reducir la producción de metano debido a que

los metanógenos asociados a protozoarios son responsables de hasta el 37% del metano entérico (Finlay et al., 1994).

Los hongos ruminales fueron descubiertos en 1975, anteriormente se creía que sus estructuras pertenecían a protozoarios flagelados. Se pueden diferenciar en levaduras y hongos propiamente dicho, siendo los primeros organismos unicelulares y los segundos multicelulares. Se ha estimado que representan hasta el 10% de la biomasa microbiana (Nagaraja, 2016). Los hongos digieren celulosa y otras fibras y además, gracias a que su micelio penetra en las partículas de alimento, rompen la fibra generando una mayor área de contacto para la digestión (Russell, 2002). Funcionalmente se pueden clasificar en anaerobios facultativos o aerobios (levaduras y algunos hongos), quienes no contribuyen en la fermentación ruminal, y anaerobios obligados, quienes sí tienen un rol importante en dicho proceso. Se han realizado experimentos donde se han eliminado o reducido los hongos ruminales, comprobando su importancia en la digestión y fermentación de carbohidratos (Nagaraja, 2016).

2.3.3. Metabolismo de los Carbohidratos: Producción de Ácidos Grasos Volátiles

El catabolismo de los carbohidratos en el rumen puede dividirse en dos etapas. La primera consiste en su digestión por enzimas microbianas extracelulares que dan lugar a glúcidos simples (McDonald et al., 2022). Estas enzimas son capaces de romper los enlaces β 1-4 entre los diversos glúcidos que componen la celulosa (en su mayoría hexosas, como la glucosa) y la hemicelulosa (en su mayoría pentosas, como la xilosa y la arabinosa). Esta es una de las principales ventajas de la fermentación microbiana ruminal debido a que los mamíferos no tienen enzimas propias que puedan romper dichos enlaces (Goff, 2015). Los glúcidos simples producidos en la primera etapa son inmediatamente absorbidos y metabolizados intracelularmente por los microorganismos para obtener energía, dando lugar a la segunda etapa. El intermediario clave entre las dos etapas es el piruvato (McDonald et al., 2022). Debido a que el ambiente ruminal es altamente anaeróbico, no puede utilizarse al oxígeno como aceptor final de electrones para la regeneración de los cofactores reducidos. En su lugar se utiliza al piruvato (Klein, 2014). Por esta razón, los productos finales de la fermentación de los carbohidratos son los AGV y gases: principalmente metano (CH_4) y dióxido de carbono (CO_2) (Naas & Pope, 2020).

Los AGV proporcionan entre el 70 al 80% de las necesidades energéticas de los rumiantes (Fahey & Berger, 1988). Los principales son el ácido acético, el ácido propiónico y el ácido butírico; todos ellos son con frecuencia denominados como sus iones disociados: acetato (C_2), propionato (C_3) y butirato (C_4), respectivamente. Otros AGV presentes en menor cantidad, pero de importancia metabólica, son el ácido valérico, el ácido isovalérico, el ácido isobutírico y el ácido 2-metilbutírico (Klein, 2014).

La formación de metano en el rumen es un proceso esencial para mantener el pH ruminal porque permite la liberación de iones de hidrógeno excedentes hacia el ambiente externo a través de la eructación (Membrive, 2016). Sin embargo, es

un fenómeno indeseable debido a la pérdida de energía. Se estima que se pierde entre el 2-12% de la energía bruta consumida por la síntesis de metano según el nivel de consumo, la digestibilidad de la dieta y el tipo de dieta. La pérdida de energía en forma de metano con dietas forrajeras y mixtas es en torno al 6,5% (Johnson et al., 1993). Los metanógenos utilizan el hidrógeno y el CO₂ que se encuentran en el rumen en la producción de metano (Öztürk & Gur, 2021). La producción de acetato genera un exceso adicional de dos protones; la producción de propionato requiere cuatro protones y la producción de butirato es neutra (Webster, 2020).

Los rumiantes absorben los AGV principalmente a través de la pared del rumen (Niwiska, 2012). El acetato llega al hígado, pero la mayor parte escapa de la oxidación y pasa a la circulación periférica (Fahey & Berger, 1988) y es utilizado por una gran variedad de tejidos como fuente de energía. La mayor parte del propionato es transportado al hígado donde se convierte en glucosa por la neoglucogénesis. El butirato es convertido a betahidroxibutirato durante su absorción por la pared del rumen; este compuesto también puede ser utilizado como fuente de energía por los tejidos (McDonald et al., 2022).

La concentración total de AGV varía mucho en función de la dieta del animal y del tiempo transcurrido desde la comida anterior, pero normalmente oscila entre 70-150 mmol/l. Los forrajes fibrosos maduros dan lugar a mezclas de AGV que contienen una elevada proporción (entre el 65 y el 70%) de ácido acético. La adición de concentrados a un forraje aumenta la proporción de propiónico a expensas del acético, siendo este efecto particularmente fuerte con dietas que contienen una alta proporción (60%) de concentrados (McDonald et al., 2022).

La producción ruminal de AGV está estrechamente relacionada con el pH ruminal, que es un importante regulador del rendimiento microbiano. El propionato se utiliza con mayor eficiencia que el acetato y el butirato. Las proporciones en las que se producen los AGV en el rumen se ven afectadas por la composición física y química de las dietas. Una mayor relación C2:C3, refleja mayor pérdida de energía en forma de metano y menor eficiencia en la utilización de la energía de los AGV. Los factores que afectan a la relación molar de los AGV incluyen el nivel de forraje, el tamaño de las partículas y la proporción de carbohidratos rápidamente fermentables. Aumentar el nivel de forraje incrementa el acetato. Alternativamente, el aumento de concentrados en las raciones aumenta la proporción de propionato (Plascencia & Zinn, 2014).

2.3.4. Metabolismo del Nitrógeno: Producción de Amoníaco

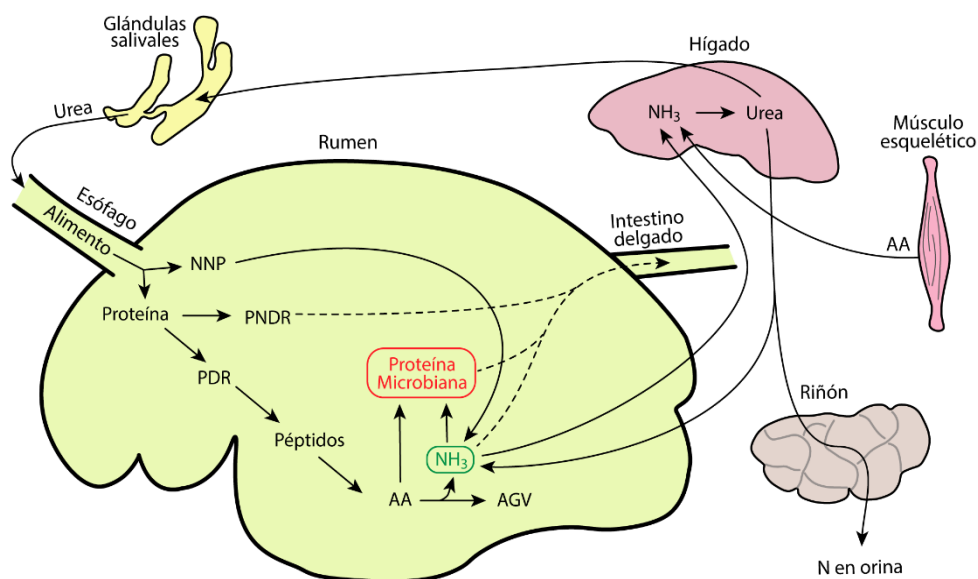
El objetivo de producción de un sistema lechero define los requerimientos de nutrientes de los animales. Si ocurren deficiencias en el suministro de nutrientes no se podrán alcanzar los objetivos propuestos, mientras que el exceso de nutrientes implica desbalances y por lo tanto ineficiencias, aumento de los costos de alimentación y mayor contaminación ambiental (Hristov & Jouany, 2005). Los rumiantes tienen la capacidad de sintetizar proteína microbiana a partir del

nitrógeno disponible en el rumen. Sin embargo, son ineficientes en cuanto a la utilización del nitrógeno de la dieta. Tamminga (1992) estimó que el 50% del nitrógeno de la dieta se pierde en la orina, y de esa cantidad el 30% proviene de pérdidas de nitrógeno en el rumen. Por esta razón mejorar la eficiencia del uso del nitrógeno en el rumen es un objetivo principal en la nutrición de los rumiantes que implica beneficios productivos y ambientales (Benchaa et al., 2009). El nitrógeno presente en la dieta de los rumiantes se encuentra en forma de proteína verdadera y en forma de nitrógeno no proteico (NNP). En el rumen, una fracción de la proteína es degradada por los microorganismos (proteína degradable en el rumen; PDR) mientras que otra escapa a la degradación (proteína no degradable en el rumen; PNDR) (McDonald et al., 2022) (figura 2).

El metabolismo del nitrógeno en el rumen se puede dividir en dos eventos importantes: degradación proteica y síntesis de proteína microbiana (Bach et al., 2005). La PDR es atacada por proteasas microbianas extracelulares que originan péptidos que son absorbidos por los microorganismos. La peptidólisis intracelular da lugar a aminoácidos que se pueden utilizar para la síntesis de proteína microbiana o pueden ser desaminados para obtener energía. Sin embargo, algunas especies de microorganismos no son capaces de utilizar aminoácidos preformados y dependen de la desaminación para la síntesis de la proteína. La desaminación de los aminoácidos libera amoníaco y un esqueleto carbonado que puede incorporarse a la ruta de los AGV (Klein, 2014) (figura 2).

El amoníaco es la fuente de nitrógeno preferida para el crecimiento de muchas bacterias y arqueas. Entre el 50 al 70% del nitrógeno bacteriano puede proceder del amoníaco (Mackie & White, 1990). Las bacterias del rumen tienen la capacidad de sintetizar todos los aminoácidos que componen su protoplasma al combinar el amoníaco con esqueletos carbonados liberados de la fermentación de los carbohidratos de la dieta (Goff, 2015).

Figura 2
Metabolismo del Nitrógeno en los Rumiantes



Nota. Esquema simplificado del metabolismo del nitrógeno en los rumiantes. Abreviaturas: nitrógeno no proteico, NNP; proteína degradable en el rumen, PDR; proteína no degradable en el rumen, PNDR; aminoácidos, AA; amoníaco, NH_3 ; ácidos grasos volátiles, AGV. Adaptado de McDonald et al. (2022) y Klein (2014).

Parte de la proteína microbiana se descompone en el rumen y su nitrógeno se recicla (es decir, es absorbido por los microorganismos). Cuando los organismos pasan al abomaso y al intestino delgado, sus proteínas celulares son digeridas y absorbidas (McDonald et al., 2022). La proteína microbiana se considera de muy alta calidad para las vacas lecheras porque tiene una alta digestibilidad (Schwab & Broderick, 2017) y su perfil de aminoácidos es similar al del músculo y leche de las vacas, lo que permite una eficiente conversión en carne y leche (Goff, 2015).

La concentración de amoníaco en el rumen depende de varias entradas y salidas (figura 2). Por un lado, proviene de la desaminación de los aminoácidos y del NNP de la dieta. Además, proviene de la degradación de la urea reciclada a través de la pared ruminal y con la saliva; y del reciclaje de la proteína microbiana. Las salidas se dan por asimilación por los microbios, por absorción a través de la pared ruminal hacia el hígado y al pasar hacia el omaso. Cambios en cualquiera de estos factores alteran la concentración de amoníaco en el rumen (Owens & Zinn, 1988).

Si la dieta es deficiente en proteína, o con alta proporción de proteína resistente a la degradación, la concentración de amoníaco será baja (en torno a 50 mg/l) (McDonald et al., 2022). En esta situación, el crecimiento microbiano será lento y se retrasará la fermentación de los carbohidratos. Por el contrario, si la proteína cruda en la dieta presenta una tasa de degradación proteica mayor que la

de síntesis, la concentración de amoníaco tenderá a aumentar. Cuando esto sucede, el amoníaco, se transporta vía porta al hígado y es metabolizado, convirtiéndose en urea o se incorpora a aminoácidos como la glutamina. Parte de esta urea puede volver al rumen a través de la saliva, y también directamente a través de la pared del rumen, pero la mayor parte se excreta en la orina y, por tanto, se desperdicia (McDonald et al., 2022).

La optimización de la síntesis de proteína microbiana implica dos conceptos. Por un lado, la cantidad de biomasa microbiana producida diariamente en función de la disponibilidad de proteína o energía en el rumen (Mansfield et al., 1994). Por otro lado, de la eficiencia de producción de la proteína microbiana medida como nitrógeno microbiano en función de la materia orgánica fermentada en el rumen. Para maximizar la eficiencia de producción, el aporte de energía y nitrógeno debe ser adecuado y deben estar disponibles en forma sincrónica (Repetto & Cajarville, 2009).

El concepto de sincronización de nutrientes se refiere al suministro de proteína y energía de forma que estén disponibles simultáneamente en las proporciones requeridas por los microorganismos ruminales. La dinámica de la energía y del nitrógeno en el rumen tiene una diferencia importante: mientras que para el caso del nitrógeno puede existir un aporte al rumen por la urea recirculante y los aminoácidos movilizados de tejidos (figura 2) para la energía no existe una fuente endógena que garantice el suministro de energía al rumen. Por este motivo, el objetivo de la sincronización es capitalizar la disponibilidad determinada de carbohidratos en el rumen (Repetto & Cajarville, 2009).

Para que el amoníaco se incorpore eficazmente a la proteína microbiana, deben cumplirse dos condiciones: en primer lugar, la concentración inicial de amoníaco debe ser inferior a la óptima; en segundo lugar, los microorganismos deben disponer fácilmente de una fuente de energía para la síntesis de proteínas (McDonald et al., 2022).

La disponibilidad de amoníaco en el rumen en los sistemas pastoriles es mayor al óptimo requerido por la microbiota ruminal. Bargo et al. (2003) reportaron valores de amoníaco ruminal entre 87 a 322 mg/l (media: 183 mg/l) para vacas lecheras en pastoreo con suplementación (1,1 a 10 kgMS/d). El óptimo para la actividad celulítica es de 58 mg/l de amoníaco (Rearte, 1993). Por lo tanto, en los sistemas pastoriles sobre pasturas templadas el factor limitante para una máxima actividad bacteriana, lo constituye la energía disponible a nivel ruminal y no la proteína (Rearte, 1994).

Un exceso de amoníaco en el rumen implica un gasto energético extra para su metabolización a urea en el hígado, una reducción de la relación proteína verdadera/NNP en leche que no es deseado para los procesos industriales y un aumento de la urea en orina que implica un impacto ambiental (García, 1997; Rearte, 1993).

Las bacterias sacarolíticas y los protozoarios entodiniomorfos son los principales responsables de la proteólisis en el rumen. Estos microorganismos tienen endoproteasas que promueven la degradación de la proteína a dipéptidos y aminoácidos. Los protozoarios entodiniomorfos se alimentan principalmente por absorción de partículas. Estos protozoarios utilizan el nitrógeno bacteriano al digerir las bacterias ingeridas en una vacuola digestiva. En cambio, los protozoarios holotricos, además de la ingestión de bacterias, absorben aminoácidos del medio (Firkins & Mackie, 2020).

La desaminación en el rumen es llevada a cabo principalmente por bacterias sacarolíticas y bacterias hiper-productoras de amoníaco o en inglés “hyper ammonia-producing bacteria” (HAP) (Firkins & Mackie, 2020). Las bacterias HAP son bacterias grampositivas y son sensibles a monensina (Eschenlauer et al., 2002). Hasta la fecha, se han identificado alrededor de 14 especies bacterianas grampositivas diferentes de HAP, pero la actividad de desaminación más alta se atribuye a *Clostridium sticklandii*, *Clostridium aminophilum* y *Prevotella ruminicola* (Szumacher-Strabel & Cielak, 2012).

2.3.5. Modulación de la Fermentación Ruminal

La manipulación de la fermentación ruminal tiene como objetivo mejorar la eficiencia de utilización de los alimentos para aumentar la productividad y reducir el impacto ambiental del proceso productivo. Básicamente, la manipulación de la fermentación tiene como objetivo potenciar los procesos beneficiosos y minimizar los procesos ineficientes o perjudiciales para el rumiante. Se debe tener en cuenta que el carácter integrado del rumen determina que ante una intervención en la fermentación se pueden provocar efectos positivos y otros negativos (Nagaraja et al., 1997).

En la tabla 2 se presentan los posibles objetivos de la manipulación de la fermentación ruminal y las ventajas asociadas mencionados por Newbold (2017).

Tabla 2*Objetivos de la manipulación de la fermentación ruminal*

Objetivo	Ventajas
Incrementar la degradación de la fibra	Mayor digestibilidad y mayor consumo de alimento
Disminuir la degradación proteica y la producción de amoníaco en el rumen	Mayor eficiencia de retención del nitrógeno: menores pérdidas económicas y contaminación ambiental
Optimizar la producción de AGV	Mayor disponibilidad de propionato para la de síntesis de glucosa
Mejorar la salud animal	Menor incidencia de cetosis (mayor producción de glucosa) y acidosis (menor producción de ácido láctico)
Disminuir la producción de GEI	Menor impacto local (menor contaminación de aire, tierra y agua) y global (reducción de emisiones de GEI)

Nota. Adaptado de Newbold (2017).**2.4. Aditivos Alimentarios**

Los alimentos pueden definirse como cualquier componente que cumpla alguna función útil en una ración, y una manera de clasificarlos es según sus características nutricionales (Cancho et al., 2000). Los alimentos se pueden clasificar en 8 categorías: forrajes y alimentos groseros, alimentos no cortados en estado fresco, ensilados, alimentos energéticos, alimentos proteicos, suplementos minerales, suplementos vitamínicos y aditivos (Harris & Utah, 1980). Los antibióticos y los extractos de plantas se clasifican como aditivos.

Los antibióticos son productos de origen microbiano que tienen la capacidad de controlar la multiplicación de otros microorganismos (Saha & Pathak, 2021). A su vez, pueden clasificarse como terapéuticos y/o profilácticos y como promotores del crecimiento. Estos últimos son sustancias naturales o sintéticas que se administran con la dieta con el fin de mejorar la eficiencia productiva a través de la manipulación de la fermentación ruminal, actúan sobre la microflora y/o el metabolismo (Cancho et al., 2000).

Los ionóforos son un grupo de antibióticos muy difundido y utilizados para mejorar la eficiencia a través de la modificación del metabolismo energético y nitrogenado, así como la reducción de patologías como acidosis y meteorismo (Castillejos & Bellaterra, 2005). Sin embargo, en los últimos años se ha prohibido y/o discontinuado el uso de varios antibióticos promotores del crecimiento por tener uso terapéutico, tanto humano como veterinario, y por ende correr el riesgo de disminuir la eficacia de este por la generación de resistencia (Cancho et al., 2000). Por esta razón, y por la menor aceptación social debido a la posible aparición de residuos y cepas resistentes, se han evaluado constantemente alternativas al uso de

los mismos, como es el caso de los aceites esenciales, levaduras, probióticos y otros aditivos derivados de plantas (Castillejos et al., 2006).

2.4.1. Ionóforos

El uso de antibióticos ionóforos en la producción animal surge como una alternativa al control de coccidiosis (anti protozario) en aves, conociéndose luego su rol en la mejora de la eficiencia alimenticia como consecuencia de la modulación ruminal (Duffield & Bagg, 2000). Durante la década de 1970, los ionóforos, principalmente monensina, fueron intensivamente probados y estudiados, difundándose su uso en rumiantes a partir de entonces. Básicamente, actúan alterando el transporte de iones a través de las membranas, lo que afecta severamente a las bacterias, particularmente gram positivas, y genera una modificación en la población ruminal que lleva a una mejora en la digestión del alimento (Bretschneider, 2009).

La definición de la dosis es un tema controversial y sobre cual se ha estudiado mucho. En el meta-análisis realizado por De Moura et al. (2021), evaluando el efecto de ionóforos (Lasalocida y Monensina) sobre consumo, producción y composición de leche y fermentación ruminal, se encontró que la dosis fue la principal covariante impactando en el resultado sobre las primeras tres variables, pero, sin embargo, no tuvo efecto en los parámetros ruminales pH, N-amoniaco, C2, C3, y C4. Por otro lado, en un trabajo donde 48 artículos con 52 estudios fueron meta-analizados (Rezaei Ahvanooei et al., 2023) se reveló la inconsistencia en la respuesta a las diferentes dosis de monensina. Este aditivo es incluido en la dieta de los rumiantes en forma de sal sódica (Duffield & Bagg, 2000) y, aunque De Moura et al. (2021) indiquen que la recomendación de dosis para vacas lecheras no está completamente definida (a diferencia de la dosis para bovinos de carne), según World Health Organization (2018) la dosis máxima recomendada para mejorar la eficiencia de la fermentación ruminal es de 360 mg/animal/día en animales de engorde o 200 mg/animal/día por cada 0.4 kg de suplemento en animales en pastoreo.

A pesar de los efectos positivos de la monensina sobre la fermentación ruminal, su uso se ha visto disminuido por una menor aceptación social a causa de la posible aparición de residuos y de cepas de bacterias resistentes a este antibiótico (Calsamiglia et al., 2007). Los antibióticos fueron prohibidos, por el principio de precaución, por la Unión Europea como promotores del crecimiento desde el año 2006 (Reglamento (CE) n° 1831/2003, 2003) y desde el año 2022 también fue prohibido su uso con fines profilácticos (Reglamento (UE) n° 2019/4, 2019). Por lo tanto, solo pueden ser utilizados para tratar una enfermedad diagnosticada. En Uruguay están prohibidos únicamente como promotores del crecimiento desde el año 2011 (Decreto N.° 98/011, 2011).

Los ionóforos son antibióticos poliéter lipofílicos lo que significa que pueden transportarse y acumularse en las membranas celulares (Russell & Houlihan, 2003). La monensina, producida por la bacteria *Streptomyces*

cinnamomensis, ubica en el interior de su molécula a un catión monovalente (sodio o potasio) y presenta un grupo carboxilo que tiene la capacidad de atraer un protón. De esta manera actúa como antiportador, transportándose a través de la membrana celular para mover estos iones en direcciones opuestas, cuyo sentido dependerá del gradiente de concentración de iones. Sólo puede moverse a través de la membrana si está unido a un ion metálico o a un protón (Russell, 2002).

Siguiendo el modelo planteado por Russell (2002), la concentración de potasio es mayor dentro de la célula, por lo que el gradiente conduce a un transporte del mismo hacia el exterior, con la consecuente entrada de un protón. En el caso del sodio el gradiente es menor y, por lo tanto, al igual que para la salida de H^+ , es necesaria la actividad de ATPasa. En otras palabras, este mecanismo influenciado por el gradiente de cationes y la afinidad catiónica de los ionóforos, resulta en una menor concentración de K^+ y pH intracelular, lo que obliga a la bacteria a utilizar sistemas celulares de transporte para disipar los protones y sodio intracelular (McGuffey et al., 2001). Es decir que, con el fin de mantener el pH celular y el balance de iones, se requiere una reasignación de los recursos donde se ve afectado el crecimiento y reproducción de las bacterias (World Health Organization, 2018).

Sin embargo, no todas las bacterias son sensibles a la monensina, dadas las diferentes estructuras de la pared celular. Las Gram negativas poseen una membrana celular formada por un complejo de capas, separadas por una capa rígida de peptidoglucano que las hace más resistentes (Pinos & González, 2000), por lo tanto, las Gram positivas son particularmente más sensibles y, además, son aquellas productoras de C_2 , C_4 e hidrógeno (Russell & Houlihan, 2003). En consecuencia, hay una mejora en la eficiencia de la digestión, ya que la producción de C_3 es más eficiente energéticamente por la menor pérdida energética, en forma de CH_4 y CO_2 , asociada a la producción de C_2 y C_4 (Castillejos & Bellaterra, 2005).

Los ionóforos son eficientes disminuyendo la producción de metano también por otra vía, ya que según Van Nevel y Demeyer (1977) citados por Castillejos & Bellaterra (2005), inhiben a aquellas bacterias productoras de H_2 y CO_2 ; en otras palabras, disminuye el sustrato para bacterias metanogénicas y por ende la síntesis y acumulación de CH_4 .

2.4.2. Efecto de la Monensina sobre los Parámetros Ruminales y la Población de Protozoarios

A continuación, se presenta un resumen de los trabajos consultados que han evaluado el efecto del uso de monensina sobre parámetros ruminales y protozoarios (tabla 3). 12 de los 15 trabajos consultados, corresponden a estudios *in vivo*, evaluando vacas en transición, lactancia temprana o media, en sistemas estabulados; del resto, 2 estudiaron bovinos de carne y 1 ovinos.

Tabla 3

Resumen de la respuesta de los distintos parámetros ruminales y población de protozoarios al uso de monensina

Referencia	Detalles del experimento		Fermentación ruminal						Ptz
	Animal	Dosis	pH	NH ₃	AGV	C2	C3	C4	
Do Prado et al. (2015)	L	16 mg/ kg MS	=	=	=	=	↑	↓	nd
Erasmus et al. (2005)	L	10 mg/ kg MS	=	=	nd	=	↑	=	nd
Benchaa et al. (2006)	L	16 mg/ kgMS	=	↓	=	=	=	=	=
Green et al. (1999)	L	335 mg/a/d	=	=	=	=	=	↓	nd
Drong et al. (2016)	L	335 mg/a/d	=	=	=	=	↑	↓	=
Schären et al. (2017)	L	335 mg/a/d	=	=	=	=	↑	=	=
Mezzetti et al. (2019)	L	335 mg/a/d	=	↓	=	=	=	=	nd
Mathew et al. (2011)	L	317 mg/a/d	=	=	=	=	=	=	=
Santos et al. (2019)	L	0, 12, 24, 48 mg/kg MS	=	=	=	=	↑	↓	nd
Granzin y Dryden (1999)	L	150, 300 mg/a/d	=	nd	=	↓	↑	=	nd
Silva et al. (2021)	L	240 mg/a/d	↓	↑	=	=	=	=	nd
Prange et al. (1978)	L	276 mg/a/d	nd	nd	↓	↓	↑	↓	nd
Dinius et al. (1976)	C	0, 11, 22, 33 mg/ kg MS	=	=	=	↓	↑	=	=
Stahringer et al. (2012)	C	200 mg/a/d	nd	nd	nd	↓	↑	=	nd
Newbold et al. (1993)	O	33 mg/ kg MS	=	=	=	↓	↑	=	↓

Nota. =, no significativo; ↑, aumento; ↓, reducción. Abreviaturas: L, bovinos de leche; O, ovinos; C, bovinos de carne; NH₃, nitrógeno amoniacal; AGV, ácidos grasos volátiles; C2, acetato C3, propionato; C4, butirato; Ptz, protozoarios; nd, no determinado en el experimento; a, animal.

2.4.2.1. Efecto de la Monensina sobre el pH Ruminal. El pH ruminal es una variable del ambiente ruminal importante dado que influye sobre la dinámica de las poblaciones de las bacterias ruminales. Por lo tanto, es importante conocer el impacto potencial que se podría generar por la utilización de aditivos alimentarios. En este sentido, la mayoría de los experimentos analizados reportan valores de pH ruminal. Uno de los efectos del uso de ionóforos, es la inhibición de la multiplicación de las bacterias gram positivas productoras de ácido láctico (Dennis et al., 1981). Consecuentemente se podría esperar la menor producción de ácido láctico, ayudando así a mantener un pH óptimo en rumen (Nagaraja et al., 1985). Sin embargo, en la mayoría de los estudios consultados, todos con vacas Holando bajo estabulación, no existieron diferencias significativas en el pH ruminal al utilizar monensina como aditivo alimentario (Benchaar et al., 2006; Drong et al., 2016; Mathew et al., 2011; Mezzetti et al., 2019; Santos et al., 2019; Schären et al., 2017). Incluso, Silva et al. (2021) reportaron una disminución del pH ruminal como resultado del uso de monensina.

2.4.2.2. Efecto de la Monensina sobre los AGV. Los aditivos alimentarios generan cambios en las poblaciones microbianas que determinan variaciones en los productos finales de la fermentación ruminal. En el caso de los AGV, se puede dar un efecto sobre la concentración total o se pueden generar cambios en las proporciones molares de los AGV.

En respuesta al uso de monensina, el incremento en la producción de propiónico es consistente en la mayoría de la bibliografía consultada (Dinius et al., 1976; Prange et al., 1978; Stahringer et al., 2012). Este efecto se traduce en un incremento en la energía obtenida a partir de una misma unidad de alimento (Oliver, 1975). En el caso del acético, se repite la consistencia en los resultados para los mismos autores, aunque el efecto de la monensina es disminuir su producción. Por lo tanto, hay una menor relación acético:propiónico. Para el ácido butírico, tanto Stahringer et al. (2012) como Dinius et al. (1976), no encontraron diferencias significativas en su producción en respuesta al agregado de monensina en la dieta; sin embargo, Prange et al. (1978) reportan una disminución con el agregado de 33 ppm de monensina en el total de la dieta.

2.4.2.3. Efecto de la Monensina sobre la Concentración de N-amoniacal. Los cambios generados en la microbiota del rumen por los aditivos alimentarios modifican el metabolismo de las proteínas en el rumen. En general, los resultados demuestran que no existen efectos del uso de monensina sobre la concentración de N-amoniacal en vacas Holando en sistemas estabulados (Do Prado et al., 2015; Erasmus et al., 2005; Green et al., 1999; Mezzetti et al., 2019). Sin embargo, Benchaar et al. (2006) en un estudio con vacas Holando lactando canuladas, también en sistema de estabulación, reportaron que la concentración de N-amoniacal disminuye al utilizar una dosis de 300 mg/d de monensina; a través de su revisión bibliográfica, atribuyen este efecto a la reducción, generada por la monensina, sobre la población de bacterias productoras de amoníaco. Por otro lado, Silva et al. (2021) encontraron un aumento en la producción de N-amoniacal que, sugieren, estaría dado por un menor consumo sin efecto en la digestibilidad de la proteína.

2.4.2.4. Efecto de la Monensina sobre la Población de Protozoarios Ruminales. Las poblaciones de protozoarios están involucradas en la digestión de la fibra y proporcionan a los metanógenos sustratos para llevar a cabo la metanogénesis. Se ha demostrado que la defaunación reduce las emisiones de metano entre un 9 – 37%. Por lo tanto, sería interesante lograr una reducción de los protozoarios ruminales, en especial aquellos actores clave que contribuyen a la metanogénesis como son los holotricos (Belanche et al., 2014). La eliminación de este subgrupo de protozoarios, sin afectar a protozoarios involucrados en la degradación de las plantas, es un reto importante que supone un desafío tecnológico (Huws et al., 2018).

A pesar de su importancia, en la mayoría de los trabajos que evalúan el efecto de los ionóforos, se ignora el estudio de la población de protozoarios. Sin embargo, en aquellos donde se ha estudiado su comportamiento, no se reportan diferencias significativas en la población en respuesta al uso de monensina (tabla 3). Sólo Newbold et al. (1993) reportaron una disminución en el número de protozoarios, evaluando el efecto de la monensina en ovejas canuladas.

Es probable que una de las razones sobre la inconsistencia de esta variable, sea que los protozoarios tienen movilidad propia y por lo tanto es difícil calcular en forma exacta la cantidad que hay presentes (Giuliodori et al., 2013).

2.4.2.5. Síntesis de Resultados y Limitantes de la Monensina. El uso de monensina como aditivo alimentario en las dietas de rumiantes ha sido ampliamente difundido. Su mecanismo de acción fue objeto de muchos estudios y está claro cómo actúa y el efecto teórico que tiene su uso. Sin embargo, al momento de consultar trabajos experimentales, se evidencian distintas respuestas frente a su uso, lo que puede adjudicarse a varios factores.

En este contexto, De Moura et al. (2021) en su meta-análisis, concluyen que el uso de monensina mejora la performance y la fermentación ruminal en vacas lecheras, independientemente del sistema de alimentación (TMR o dieta basada en

pasturas). Sin embargo, reportan que su efecto es dependiente de la dosis y la etapa de lactancia. Duffield et al. (2008), a diferencia del trabajo citado anteriormente, concluyen que la dieta influye en el efecto de la monensina, siendo los animales que reciben dietas basadas en pasturas los que más aumentan su producción en respuesta al agregado de este aditivo, en comparación con aquellos consumiendo TMR. Además de esto y la dosis y etapa de lactancia, incluyen a la duración del tratamiento, método de inclusión de la monensina (cápsula, top-dress, núcelo) y raza, como factores que podrían influir en la respuesta. Otros autores, también atribuyen la inconsistencia de los resultados a la condición corporal y potencial genético (Rezaei Ahvanooei et al., 2023).

2.4.3. Extractos de Plantas

Las plantas poseen la característica particular de presentar un metabolismo secundario que les permite sintetizar compuestos diversos denominados metabolitos secundarios. Se definen así por no participar de los procesos bioquímicos primarios que ocurren en las plantas como son el crecimiento, desarrollo y reproducción (Bodas et al., 2012). En estos procesos los compuestos producidos son los metabolitos primarios como los carbohidratos, proteínas y lípidos comunes a todos los seres vivos (Bernhoft, 2010).

Los metabolitos secundarios desempeñan una variedad de funciones ecológicas en las plantas como resultado de la evolución (Valares Mesa, 2011). De esta forma las plantas tienen la capacidad de supervivencia frente a amenazas bióticas (bacterias, virus, insectos, malezas), abióticas (radiación ultravioleta, temperaturas extremas) y desastres naturales (inundaciones, tornados) (Lustre Sánchez, 2022).

Desde mediados del siglo XX, la mejora continua en las técnicas analíticas ha permitido la identificación de más de 200.000 metabolitos secundarios de plantas (Bourgoud et al., 2001; Hartmann, 2007). Sin embargo, su presencia y concentración varían temporalmente y entre especies. Estas dos fuentes de variación se originan por la etapa fenológica de la planta al momento de su extracción, factores ambientales y diferencias genéticas entre los materiales vegetales (Estell, 2010).

Los extractos de plantas contienen los compuestos bioactivos que son aquellos metabolitos secundarios que poseen efectos farmacológicos o toxicológicos en humanos y animales (Bernhoft, 2010). Se han utilizado como nutraceuticos para proporcionar un beneficio para la salud además de la nutrición básica (Zhao et al., 2015). Por esta razón, las compañías farmacéuticas y de nutrición animal analizan rutinariamente los metabolitos secundarios para obtener nuevos medicamentos o aditivos para raciones (Bodas et al., 2012).

Los principales grupos de metabolitos secundarios de las plantas son los aceites esenciales, los compuestos fenólicos y las saponinas. A los efectos de la

presente revisión se presenta información de los primeros dos grupos por ser compuestos presentes en el aditivo a ser evaluado.

2.4.3.1. Aceites Esenciales. Los aceites esenciales son líquidos con apariencia oleosa compuestos por metabolitos secundarios de plantas con puntos de ebullición bajos que los vuelven volátiles. Se denominan “esenciales” por ser la “esencia” de las plantas al definir su fragancia (Benchaar et al., 2009). Químicamente, son mezclas complejas formadas por alcoholes, ésteres o aldehídos (Jouany & Morgavi, 2007) con uno o dos componentes principales (Benchaar et al., 2009).

Estas sustancias consisten básicamente en dos clases de compuestos: los terpenos y los fenilpropanos (Lee et al., 2004). Los terpenos son el grupo de metabolitos secundarios de plantas más numeroso y diverso, con alrededor de 15.000 compuestos conocidos. Presentan una gran variedad y complejidad química, pero con un origen biosintético común. Por lo tanto, no es sencillo generalizar sobre sus propiedades químicas salvo que en su mayoría son sustancias lipofílicas (Gershenzon & Croteau, 1991). Los monoterpenos son un tipo de terpenos que comprenden el 90% de los aceites esenciales. Ejemplos de monoterpenos son el linalool, carvacrol y timol (Yáñez-Ruiz & Belanche, 2020). Los fenilpropanos no son los compuestos más comunes pero algunas plantas los tienen en proporciones significativas (Calsamiglia et al., 2007). Ejemplos de estos compuestos son el cinamaldehído, eugenol, anetol (Yáñez-Ruiz & Belanche, 2020) y la piperina (Seigler, 1998).

Es probable que la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales sea generada por diferentes mecanismos de acción. Esto se debe a la gran cantidad de moléculas presentes en los aceites esenciales (Burt, 2004). Por lo tanto, existen numerosas hipótesis que intentan explicar su actividad antimicrobiana. Una de ellas se basa en la hidrofobicidad de estos compuestos que les permite interactuar con las membranas de las bacterias, acumulándose en la bicapa lipídica. Esta interacción genera una mayor permeabilidad de la membrana que determina la fuga de iones. En consecuencia, se genera una reducción del gradiente de pH a través de la membrana que causa una disminución del gradiente eléctrico inhibiendo la síntesis de ATP (Sikkema et al., 1994). Las bacterias utilizan una gran cantidad de energía para contrarrestar estos efectos utilizando bombas de iones. De esta forma el crecimiento bacteriano se enlentece y se produce un cambio en las proporciones de las poblaciones bacterianas que se traduce en variaciones en los productos finales de la fermentación (Calsamiglia et al., 2007).

Las bacterias grampositivas suelen ser más sensibles a los aceites esenciales que las bacterias gramnegativas (Smith-Palmer et al., 1998). Esta sensibilidad diferencial se explica por las diferencias estructurales entre los dos grupos bacterianos. Aunque las bacterias grampositivas tienen una cubierta celular de mayor grosor, las gramnegativas presentan una membrana externa que contiene polisacáridos unidos a los fosfolípidos denominada capa de lipopolisacárido

(Madigan et al., 2015). Esta capa genera una superficie hidrofílica alrededor de las bacterias gramnegativas y por lo tanto actúa como una barrera a la penetración de compuestos lipofílicos como son los aceites esenciales. Sin embargo, la membrana externa no es completamente impermeable y algunas pequeñas moléculas hidrofóbicas pueden atravesarla lentamente a través de porinas (Helander et al., 1998).

La mayor parte de la investigación de los efectos de los aceites esenciales en la fermentación se ha realizado en estudios *in vitro* por cuestiones prácticas y debido a la gran cantidad de compuestos disponibles para su estudio (Benchaa et al., 2009). Sin embargo, la diversidad y complejidad del ecosistema ruminal es una limitante para su simulación en modelos *in vitro*. Por lo tanto, una vez que se han identificado compuestos prometedores, la experimentación debe llevarse a pruebas *in vivo* (Benchaa et al., 2009). Generalmente, a nivel comercial se ofrecen mezclas de aceites esenciales. Se ha sugerido que el uso de mezclas genera efectos sinérgicos y por lo tanto es una mejor estrategia para modular la fermentación que el uso de compuestos puros (Hassan et al., 2020).

2.4.3.2. Compuestos Fenólicos. Los compuestos fenólicos se caracterizan por presentar uno o más grupos hidroxilo (-OH) unidos a un anillo aromático (grupo fenol). Comprenden un grupo con más de 10.000 compuestos diferentes (Viña, 2013). Son producidos por bacterias, hongos y organismos marinos pero principalmente se obtienen de plantas. Según su estructura química se pueden clasificar en fenoles simples, ácidos fenólicos, cumarinas, flavonoides, taninos, estilbenos, lignanos, quinonas y curcuminoides (Ecevit et al., 2022).

Los curcuminoides son polifenoles presentes en los rizomas de la cúrcuma (*Curcuma spp.*). Se ha estudiado por sus efectos antiinflamatorios, antimicrobianos y antitumorales (Ecevit et al., 2022).

Los taninos son un grupo heterogéneo de polifenoles de alto peso molecular (Fraga-Corral et al., 2021) con la capacidad de formar enlaces con proteínas y otras macromoléculas como celulosa y almidón (Van Soest, 1994). La presencia de taninos en la dieta de los rumiantes es muy común, especialmente en sistemas pastoriles. Muchas leguminosas como *Lotus corniculatus*, *Lotus pedunculatus* y *Vicia sativa* contienen taninos, así como la achicoria (*Cichorium intybus*) (Yáñez-Ruiz & Belanche, 2020).

La reducción de la degradación ruminal de las proteínas es el efecto más significativo y conocido de los taninos. Los taninos tienen una gran afinidad por las proteínas, y el pH neutro del rumen favorece la formación de complejos tanino-proteína. En general, esta reducción de la degradación proteica se asocia a una menor producción de nitrógeno amoniacal (Frutos et al., 2004). Se ha descrito que los taninos tienen un efecto antimicrobiano sobre algunos microbios del rumen, al alterar la permeabilidad de las membranas (Frutos et al., 2004). Sin embargo, este efecto antimicrobiano depende en gran medida de la dosis y de la naturaleza del tanino, así como de la especie microbiana (Yáñez-Ruiz & Belanche, 2020).

2.4.4. Efecto de los Extractos de Plantas sobre los Parámetros Ruminales y la Población de Protozoarios

En la tabla 4 se presenta un resumen de las publicaciones que describen el efecto de los extractos de plantas en la fermentación ruminal y en la población de protozoarios en estudios *in vivo*.

Tabla 4

Resumen de estudios in vivo que describen el efecto de los extractos de plantas en la fermentación ruminal y en la población de protozoarios

Referencia	Detalles del experimento			Fermentación ruminal						Ptz
	Ani.	Dosis*	Tiempo	pH	NH ₃	AGV	C2	C3	C4	
Kholif et al. (2021)	L	AE 3 g/a/d	12	↑	↓	↑	↑	↑	↓	nd
Benchaaar (2020)	L	AE 50 mg/kgMS	4	=	=	=	=	=	=	=
Elcoso et al. (2019)	L	AE 1 g/d	8	=	=	=	=	↓	=	nd
Olijhoek et al. (2019)	L	AE 201-244 mg/kgMS	4	=	=	=	=	=	↑	nd
Da Silva et al. (2020)	L	AE 150 mg/kgMS	8	nd	nd	nd	↓	↑	=	=
Ghizzi et al. (2018)	L	AE 500 mg/kgMS	6	=	=	=	=	=	=	nd
Silva et al. (2018)	L	AE 44 mg/kgMS	3	=	=	=	↑	=	↑	nd
Soltan et al. (2018)	O	AE 400 mg/kgMS	2	↓	=	↑	=	↑	↑	↓
Kholif et al. (2018)	O	AE 2 ml/d	12	=	=	↑	=	↑	↓	nd
Canaes et al. (2017)	Cp	AE 0,02-0,24 ml/kgPV	2	=	=	=	=	=	=	nd
Kholif et al. (2017)	Cp	AE 10 g/a/d	12	=	=	↑	=	↑	↓	nd
Klop et al. (2017)	L	AE 0,17 g/kgMS	2	=	=	=	↓	↑	=	nd
Matloup et al. (2017)	L	AE 14 ml/a/d	9	nd	↓	=	=	=	=	nd
Blanch et al. (2016)	L	AE 200-400 mg/a/d	4	=	=	=	=	=	=	nd
Cobellis et al. (2016)	O	AE 7 g/a/d	3	=	=	=	=	=	=	=

Ferreira de Jesus et al. (2016)	L	AE 500 mg/kgPV	3	=	=	=	=	↑	=	nd
Khorrami et al. (2015)	C	AE 0,5 g/a/d	3	=	=	=	=	=	=	nd
Tomkins et al. (2015)	C	AE 1-2 g/a/d	6	=	=	=	=	=	↑	nd
Flores et al. (2013)	L	AE 200-600 mg/a/d	6	=	=	=	=	=	=	nd
Lin et al. (2013)	O	AE 0,5-1 g/a/d	3	=	↓	↓	=	↑	↓	↓
Tekippe et al. (2013)	L	AE 525 mg/a/d	4	=	=	=	=	=	=	=
Chaves et al. (2011)	O	AE 100-400 mg/kgPV	18	=	=	=	=	=	=	nd
Giannenas et al. (2011)	L	AE 50-150 mg/kgMS	22	=	=	=	=	↑	=	nd
Tager y Krause (2011)	L	AE 0,5-10 g/a/d	3	=	=	=	=	=	=	nd
Yang et al. (2010)	C	AE 400-600 mg/kgMS	3	=	=	=	↓	=	=	=
Chaves et al. (2008a)	O	AE 200 mg/kgMS	2	=	=	=	=	=	=	nd
Chaves et al. (2008b)	O	AE 0,2 g/kgMS	11	↓	=	↑	=	=	=	nd
Benchaar et al. (2007)	L	AE 750 mg/a/d	4	=	=	=	=	=	=	=
Cardozo et al. (2006)	L	AE 2 g/a/d	3	=	↓	=	↓	↑	=	↓
Mohammed et al. (2004)	L	AE 2% dieta MS	4	=	↓	=	↓	↑	↑	=
Cieslak et al. (2012)	L	TS 2 g/KgMS	3	=	↓	=	=	↑	↓	↓
Dschaak et al. (2011)	L	TS-HF 22 g/KgMS	3	=	=	=	↑	↑	↑	nd

Dschaak et al. (2011)	L	TS-LF 22 g/KgMS	3	=	=	=	=	=	=	nd
Aguerre et al. (2016)	L	TS 4-18 g/KgMS	3	=	↓	=	=	=	=	nd

Nota. Abreviaturas: =, no significativo; ↑, aumento; ↓, reducción; nd, no determinado en el experimento; L, bovinos de leche; O, ovinos; C, bovinos de carne; Cp, caprinos; NH₃, nitrógeno amoniacal; AGV, ácidos grasos volátiles; C2, acetato C3, propionato; C4, butirato; Ptz, protozoarios; a, animal. *Previo a la dosis se indica el tipo de extracto: AE, aceites esenciales y TS, taninos; HF, forraje alto; LF, forraje bajo. Los efectos sobre los AGV individuales refieren a cambios en la proporción molar de cada uno. El tiempo está expresado en semanas.

Para la elaboración de la tabla 4 se utilizaron las revisiones realizadas por Hassan et al. (2020), Kholif y Olafadehan (2021) y Yáñez-Ruiz y Belanche (2020). Además, se agregaron experimentos no considerados por estos autores. En los experimentos que se evaluaron más de una dosis o tipo de compuesto se hizo una selección a los efectos del resumen.

2.4.4.1. Efecto de los Extractos de Plantas sobre el pH Ruminal. En tres experimentos de un total de 32, que reportaron valores de pH ruminal, se registraron cambios atribuibles a la utilización de extractos de plantas (tabla 4). Por un lado, Soltan et al. (2018) y Chaves et al. (2008b) reportaron una reducción del pH ruminal. En ambos experimentos se registró un aumento de la concentración de AGV que pudo haber determinado la reducción del pH. Por otro lado, Kholif et al. (2021) reportaron un aumento del pH ruminal. Los autores explican que este efecto pudo deberse a algún componente bioactivo de la mezcla utilizada.

Brevemente, la utilización de aceites esenciales no resultó en cambios en el pH ruminal en la mayoría de los experimentos *in vivo* analizados. Evitar la reducción del pH ruminal al utilizar aditivos es muy importante para prevenir la reducción de la actividad de la flora celulolítica.

2.4.4.2. Efecto de los Extractos de Plantas sobre los AGV. En la mayoría de los estudios *in vitro*, la utilización de aceites esenciales ha causado una disminución o ningún cambio en la concentración de AGV. Castillejos et al. (2006) concluyen que la mayoría de los compuestos de aceites esenciales evaluados tuvieron una actividad antimicrobiana importante, modificando la fermentación microbiana del rumen, sin disminuir la concentración total de AGV con dosis apropiadas. Elevadas dosis *in vitro* generan una inhibición general de la fermentación que determina una reducción de los AGV totales (Busquet et al., 2006). En seis experimentos *in vivo* de un total de 33 que reportaron valores de producción de AGV, se registraron cambios atribuibles a la utilización de extractos de plantas (tabla 4). En los experimentos que se observó un aumento de la producción de AGV (Chaves et al., 2008b; Kholif et al., 2018, 2021; Soltan et al., 2018) los autores sugieren que pudo haberse mejorado la fermentación ruminal logrando una mayor utilización de los nutrientes. Lin et al. (2013) reportan una reducción de la concentración de AGV por el uso de altas dosis que determinó una disminución de la digestibilidad ruminal como ocurrió en algunos de los experimentos *in vitro*. En el experimento de Dschaak et al. (2011) la disminución de la concentración de AGV se asocia a la disminución del consumo de forraje observada en el tratamiento con taninos (6%).

Varios estudios *in vitro* han demostrado que ciertos aceites esenciales cambian las proporciones de los AGV, con una disminución de acetato y un aumento de propionato que se considera un resultado favorable (Benchaar et al., 2008). En la mayoría de los experimentos *in vivo* (tabla 4), que se observaron cambios en las proporciones de AGV, se dio una reducción de acetato y un aumento de propionato. Este efecto se puede explicar por la inhibición de bacterias Gram-positivas. Russel y Strobel (1989), como se cita en Castillejos et al. (2007), indican que este grupo de bacterias está involucrado en los procesos de fermentación que producen acetato, entre otros productos finales. Por otro lado, las bacterias Gram-negativas (productoras de propionato) podrían ocupar el nicho y de esta forma aumentar la producción de propionato (Bodas et al., 2012). Esta variación en el perfil de AGV es beneficiosa debido a que el propionato es el precursor que realiza el mayor aporte para la gluconeogénesis en el período de transición de las vacas lecheras (Reynolds et al., 2003).

2.4.4.3. Efecto de los Extractos de Plantas sobre la Concentración de N-amoniacal. Los aceites esenciales suelen reducir el N-amoniacal en el rumen mejorando la utilización de las proteínas de la dieta (Bodas et al., 2012). Existen principalmente dos vías para lograr la reducción del N-amoniacal en el rumen por el uso de aceites esenciales. Por un lado, la acción inhibitoria sobre las bacterias HAP determina una inhibición de la desaminación (McIntosh et al., 2003) y por lo tanto una menor concentración de N-amoniacal (Busquet et al., 2005). Por otro lado, la disminución de la población de protozoarios ruminales provocada por los aceites esenciales (Torres et al., 2020) podría contribuir a reducir la concentración de N-amoniacal dado que están activamente implicados en la degradación de las proteínas de los alimentos en el rumen (Jouany, 1996).

La reducción del N-amoniacal por el uso de aceites esenciales no se ha observado en forma convincente. Hristov et al. (2008) evaluaron 40 aceites esenciales *in vitro* y solo uno provocó una reducción de N-amoniacal estadísticamente significativa (aceite esencial de alcaravea, "*Carum carvi*"). Cabe señalar que los efectos de los aditivos sobre el metabolismo del nitrógeno son menores y más variables que los efectos observados sobre el metabolismo energético (Busquet et al., 2005). Además, es posible que se requiera un largo tiempo de adaptación de las bacterias a los aceites esenciales para disminuir las concentraciones de N-amoniacal (Bodas et al., 2012).

En base a los experimentos *in vivo* analizados (tabla 4), se registraron efectos en la concentración de N-amoniacal en 7 de los 33 experimentos que reportaron valores de esta variable. A continuación, se resumen los 7 experimentos que registraron efectos significativos.

En el experimento de Lin et al. (2013) los tres tratamientos con aceites esenciales generaron una reducción sobre la concentración de N-amoniacal ($p < 0,01$), con una media de 12,9 mg/dL de N-amoniacal, y una reducción del 13% respecto al control.

Cardozo et al. (2006) evaluaron el uso de aceites esenciales en vaquillonas Holando. Uno de los tratamientos fue 2g/vaca/día de aceite esencial de anís. Estos autores reportaron una reducción de la concentración de N-amoniacal ($p < 0,05$) de un 21% en relación con el tratamiento control. Los autores sugieren que los aceites esenciales lograron inhibir la desaminación de aminoácidos, aunque aclaran que también podría deberse a la reducción del recuento de protozoarios.

En el experimento llevado a cabo por Kholif et al. (2021) se registró una reducción de la concentración de N-amoniacal ($p < 0,01$) en los dos tratamientos con aceites esenciales, con una media del 16% menor en relación con el tratamiento control.

Mohammed et al. (2004) evaluaron el uso de aceites esenciales en novillos Holando. Los tratamientos fueron un control y suplementación al 2% MS de la dieta dos veces al día con aceites esenciales (un complejo entre aceite de rábano picante

y un oligosacárido llamado α -ciclodextrina). Al final de la cuarta semana se tomaron muestras del líquido ruminal a las 2 y 5 horas posteriores a la alimentación. En promedio, la concentración de N-amoniaco se redujo ($p=0,05$) una media de 14% en relación con el tratamiento control.

Matloup et al. (2017) evaluaron el aceite de cilantro en vacas lecheras en lactancia temprana. Este aceite contiene como compuesto principal el linalool. El experimento constó de tres tratamientos: un control, suplementación con 4g/vaca/día de salinomicina (ionóforo) y suplementación con 14 ml/vaca/día de aceite de cilantro. Se desarrolló durante 63 días. En los días 30 y 63 se tomaron muestras del líquido ruminal a las 3 horas de suministrar el alimento de la mañana. El tratamiento con ionóforo no mostró un efecto significativo en la concentración de N-amoniaco. En cambio, en el tratamiento con aceite de cilantro, la concentración de N-amoniaco en el rumen se redujo ($p<0,001$) un 31% (media) en relación con el tratamiento control.

La capacidad de los taninos de formar complejos con las proteínas, los vuelven compuestos interesantes para reducir la degradación proteica en el rumen. Cieslak et al. (2012) evaluaron los efectos de la suplementación con taninos en la fermentación ruminal de vacas lecheras en el cuarto mes de lactancia. Se utilizaron cuatro vacas lecheras en su cuarto mes de lactancia. Los tratamientos fueron un control y suplementación con 140g de extractos que contenían el equivalente a 2 g de taninos/kgMS (extraídos de la planta *Vaccinium Vitis-Idaea*). Se realizó un diseño cruzado con periodos de 24 días. El tratamiento con taninos determinó una reducción en la concentración de N-amoniaco ($p<0,001$) del 46% (media) en relación con el tratamiento control.

Aguerre et al. (2016) evaluaron un extracto de plantas compuesto por una mezcla de taninos (*Schinopsis balansae* y *Castanea dentata*) en vacas lecheras. El experimento constó de cuatro tratamientos: un control, y tres tratamientos con diferentes dosis de taninos. Se realizó un diseño cruzado con periodos de 21 días. Se detectaron diferencias significativas para la concentración de N-amoniaco ($p<0,01$). En promedio, en los tratamientos con taninos la concentración de N-amoniaco se redujo 14%. La reducción en el tratamiento con mayor dosis de taninos fue del 22%.

En los experimentos que se obtuvo diferencias significativas, la media de la reducción de la concentración de N-amoniaco fue de 22%.

2.4.4.4. Efecto de los Extractos de Plantas sobre la Población de Protozoarios Ruminales. Algunos extractos de plantas como los taninos y las saponinas han sido extensamente estudiados por sus efectos inhibitorios sobre la población de protozoarios ruminales. Sin embargo, pocos estudios han estudiado el efecto de los aceites esenciales sobre la población de protozoarios (Benchaar et al., 2008). En la mayoría de los estudios *in vivo* analizados (tabla 4) no se determinó el efecto de extractos de plantas sobre la población de protozoarios y en los que lo evaluaron en su mayoría no encontraron efectos significativos.

En el experimento de Lin et al. (2013) la población de protozoarios disminuyó con relación al control ($p < 0,05$) un 74%. Los protozoarios fueron reportados como porcentaje con relación al total de la población de bacterias. La media de los tratamientos con aceites esenciales fue de 0,9% y el valor del tratamiento control fue de 3,5%. Cardozo et al. (2006) reportaron una media de $\log_{10} 4,78$ protozoarios/ml en el tratamiento con aceite de anís, que representa un 4% de reducción respecto al control ($p < 0,05$). Soltan et al. (2018) realizaron un experimento con ovejas en el que evaluaron una mezcla de aceites esenciales (cinnamaldehído, eugenol, carvacrol y oleoresina de *Capsicum* sp.). Los tratamientos fueron un control, 200mg/kgMS y 400mg/kgMS (EO400). Realizaron mediciones en los días 1, 2, 3, 7 y 15. Se registraron diferencias en la población de protozoarios con la mayor dosis ($P < 0,05$). Cabe señalar que estas diferencias se observaron en los días 7 y 15. La media general del tratamiento EO400 fue de $14,8 \times 10^5$ protozoarios/ml, este valor representa una reducción del 10% con relación al control.

En el experimento de Cieslak et al. (2012) se registró una reducción de la población de protozoarios ($p < 0,001$) en el tratamiento con taninos. En este experimento se tomaron muestras en a las 0, 3 y 6 horas luego de la alimentación de la mañana. La media del tratamiento con taninos fue un 35% menor que el tratamiento control.

En los experimentos que se obtuvo diferencias significativas, la media de la reducción de la población de protozoarios fue de 31%. Se destaca que en 3 de los 4 experimentos que detectaron una reducción de los protozoarios, se observó una reducción de la concentración de N-amoniacal. Como fue mencionado, esta asociación puede presentarse en situaciones donde la proteína de la dieta es baja y, al disminuir la población de protozoarios, se digieren menos bacterias y por lo tanto aumenta la utilización del N-amoniacal por las mismas (Nagaraja, 2016).

2.4.4.5. Síntesis de los Resultados y Limitantes los Extractos de Plantas.

Los efectos de los extractos de plantas sobre la fermentación ruminal son variables, y a menudo contradictorios. El origen de la variabilidad encontrada tiene múltiples causas. Por un lado, existen variaciones en la composición química de los compuestos por diferencias en el origen de las plantas, las condiciones de crecimiento y los métodos de extracción y procesamiento. Por otro, los diversos métodos de aplicación y las condiciones de alimentación son otros factores que generan variación (Hassan et al., 2020).

Los reducidos efectos encontrados en la mayoría de los experimentos *in vivo* podrían explicarse por un corto período de tiempo de cada tratamiento. Yáñez-Ruiz y Belanche (2020) mencionan que un estudio típico *in vivo* implica un diseño de cuadrado latino en el que todos los animales reciben todos los tratamientos en períodos sucesivos. Estos autores señalan que es posible que se necesite un período de tiempo de cada tratamiento mayor para observar las diferencias entre ellos.

Existen algunas limitantes para lograr buenos resultados con el uso de extractos de plantas. Por un lado, se ha comprobado que la microbiota ruminal puede adaptarse a estos compuestos reduciendo los efectos deseados (Bodas et al., 2012). Por otro lado, no se conoce la dosis óptima para muchos de los aditivos comercializados. Por un lado, se requieren altas dosis para alterar la fermentación y lograr una reducción de la degradación de proteínas, pero altas dosis pueden inhibir la fermentación por la gran acción antimicrobiana y así disminuir la degradación de los alimentos (Benchaar et al., 2009).

2.5. Hipótesis

La hipótesis principal es que la incorporación de aditivos alimentarios, en vacas lecheras durante el período de transición e inicio de lactancia en sistemas pastoriles mixtos, permite una modulación beneficiosa de la fermentación ruminal mejorando la eficiencia de utilización de nutrientes en el rumen. Por lo que esperamos:

1. Una reducción de la concentración de N-amoniaco y de la población de protozoarios en los grupos MON y EXP con relación al grupo CON.
2. Un aumento de la concentración de C3 que determina una menor relación C2/C3 en los grupos MON y EXP con relación al grupo CON.
3. Valores de pH ruminal y de AGVt similares para los tres grupos.

3. Materiales y Métodos

3.1. Localización y Período Experimental

El experimento se llevó a cabo en la Estación Experimental Dr. Mario A. Cassinoni (EEMAC), perteneciente a la Facultad de Agronomía, ubicada en el km. 363 de la Ruta 3 (Paysandú, Uruguay, 32°23'8"S, 58°3'20"O). Se desarrolló en el período entre el 18 de febrero y el 10 de junio de 2022. El protocolo experimental fue aprobado por la Comisión de ética en uso de animales Honoraria de Experimentación Animal (CUEA), Facultad de Agronomía de la Universidad de la República, ID 1330 Exp. 020300-000055-22.

3.2. Animales y Diseño Experimental

El rodeo experimental constó de 60 vacas Holando con parto previsto en otoño. Las mismas fueron estratificadas por número de lactancia (NL), fecha probable de parto (FPP), peso vivo (PV) y condición corporal (CC) y asignadas al azar 30 días antes de la FPP y hasta los 60 días post parto a cada uno de los tratamientos. Nueve de las vacas fueron fistuladas antes de empezar el experimento y fueron utilizadas para los muestreo de parámetros ruminales y conteo de protozoarios. Al inicio del experimento, contaban con un peso vivo de 608 ± 66 Kg y un estado corporal de $3,3 \pm 0,3$ considerando la escala del 1 al 5. La fecha promedio de parto fue el 24/03/2022 ± 12 días.

Se realizó un diseño completamente al azar (DCA) con 3 tratamientos y 3 repeticiones. Las 9 vacas fistuladas se sortearon aleatoriamente en cada tratamiento, siendo cada vaca considerada una unidad experimental.

3.3. Tratamientos

El diseño experimental contó con 3 tratamientos: monensina (MON; 300mg/animal/día) y extractos de plantas (EXP; 50g/animal/día que contiene trans-cinamaldehído, flavonoides, curcuminoides y piperina), ambos agregados en el concentrado de la dieta, y un tratamiento control (CON) sin agregados de aditivos. Con el objetivo de facilitar el manejo operativo se asignaron a los tratamientos los colores rojo, azul y verde respectivamente.

3.4. Instalaciones y Rutina

Se realizaron 2 ordeñes diarios a las 05:00 hs y a las 16:00 hs. La sala de ordeño se encuentra lindera al establo y cuenta con 8 órganos dispuestos en forma de espina de pescado.

Durante el preparto los animales estaban completamente estabulados, consumiendo una ración totalmente mezclada (RTM). Luego del parto, se suministró una dieta parcialmente mezclada (DPM). Las vacas accedieron a un turno de pastoreo entre el ordeño de la mañana y el de la tarde (acceso de 8 horas) y a una RTM durante el encierre vespertino/nocturno.

La estabulación de los animales se realizó en un galpón con cama caliente (compost-barn), con aspersión, ventilación y agua ad libitum. La cama caliente fue movida dos veces al día para permitir una correcta aireación, y se realizaron monitoreos de control periódicos de temperatura y humedad. El galpón cuenta con 16 corrales de 70 m² cada uno, con capacidad para 5 vacas; cada corral cuenta con un comedero de hormigón con un largo variable por tener divisiones móviles que facilitan el manejo operativo.

3.5. Alimentación

3.5.1. Alimentación Preparto

Treinta días antes de la fecha prevista del parto (31 ± 11 días) los animales estaban estabulados y consumían una RTM. La proporción de los alimentos de la dieta (tabla 5) fue la misma para todos los animales. El total ofrecido promedio de la dieta, fue 13,6KgMS/a/d para vacas primíparas y 16,9KgMS/a/d para y las multíparas.

Tabla 5

Proporción de los alimentos de la RTM (base seca)

Alimentos	Proporción (%)
Heno de cebada	31
Ensilaje de maíz	39
Concentrado	30
Relación forraje/concentrado	70/30

Los alimentos se mezclaban en un mixer vertical con el siguiente orden: heno de cebada, ensilaje de maíz y concentrado. Se agregaba agua con el objetivo de ajustar el contenido de materia seca de la dieta. La secuencia de suministro de la dieta fue tratamiento rojo, azul y verde y se respetó durante todo el preparto.

Se resume la composición de los alimentos del concentrado preparto (tabla 6), que se suministraron en forma de peleteado.

Tabla 6

Proporción de ingredientes del concentrado preparto (base seca)

Concentrado preparto	
Alimentos	Proporción (%)
Harina de soja	54
Afrechillo de trigo	15
Grano de maíz	15
Premezcla ^a	16

Nota. ^a La premezcla contiene sales minerales y el aditivo en los tratamientos MON y EXP.

En la tabla 7 se presenta la composición química de la RTM ofrecida para cada tratamiento. Los datos refieren al análisis de una muestra compuesta formada por las muestras tomadas durante el preparto.

Tabla 7

Composición química de la RTM para cada tratamiento (base seca) durante el parto

Análisis (%) ^b	Tratamiento ^a		
	CON	MON	EXP
MS	44,2	42,3	43,8
MO	91,5	91,6	90,1
PC	13,1	13,5	13,3
^a FDN _{mo}	42,8	43,3	40,7
FDA _{mo}	28,3	27,8	26,4

Nota. ^a Los tratamientos son control (CON), monensina (MON) y extractos de plantas (EXP). ^b Los análisis químicos realizados son contenido de materia seca (MS), materia orgánica (MO), proteína cruda (PC), fibra detergente neutro extraída con alfa amilasa y libre de cenizas (^aFDN_{mo}) y fibra detergente ácida libre de cenizas (FDA_{mo}).

3.5.2. Alimentación Posparto

Durante el posparto y por sesenta días ($+63 \pm 11$ días) las vacas se manejaron en un sistema mixto de alimentación. Por la mañana tuvieron una sesión de pastoreo y luego del ordeño de la tarde accedían al galpón con cama caliente donde tenían disponible una RTM.

Durante el pastoreo las vacas accedían a parcelas semanales por tratamiento entre las 07:00 hs y las 15:00 hs (8 horas). Las parcelas se dimensionaron teniendo en cuenta la disponibilidad de entrada con el objetivo de asignar 30KgMS/animal/día (durante los 7 días). La asignación real fue de 28 ± 5 kgMS/animal/día. Cada parcela contaba con un bebedero con disponibilidad de agua ad libitum. Durante el experimento las vacas pastorearon diferentes tipos de pasturas. Sin embargo, se puso como condicionante que al momento de toma de muestras ruminales las vacas tenían que haber estado pastoreando alfalfa por al menos 10 días para lograr adaptar las condiciones ruminales a las generadas por este tipo de pastura.

En la siguiente tabla se presenta la composición química de la alfalfa. Los datos refieren al promedio de los análisis de las muestras de hand-clipping de alfalfa tomadas durante el posparto según Mannetje (2000) (tabla 8). Por lo tanto, hacen referencia a lo seleccionado por los animales.

Tabla 8*Composición química de la alfalfa (base seca)*

Análisis (%)^a	Alfalfa
MS	27,4±2,5
MO	90,0±0,2
PC	17,4±1,3
^a FDN _{mo}	41,6±3,9
FDA _{mo}	24,3±1,3

Nota. ^a Los análisis químicos realizados son contenido de materia seca (MS), materia orgánica (MO), proteína cruda (PC), fibra detergente neutro extraída con alfa amilasa y libre de cenizas (^aFDN_{mo}) y fibra detergente ácida libre de cenizas (FDA_{mo}).

La proporción de los alimentos de la RTM fue la misma para todos los animales (tabla 9). El total ofrecido de RTM promedio de las vacas primíparas fue de 13,2KgMS/a/d y el de las multíparas 16,0KgMS/a/d.

Tabla 9*Proporción de los alimentos de la RTM (base seca) durante el posparto*

Alimentos	Proporción (%)
Heno de alfalfa	14
Ensilaje de maíz	31
Concentrado	55
Relación forraje/concentrado	45/55

Los alimentos se mezclaban en un mixer vertical con el siguiente orden: heno de alfalfa, ensilaje de maíz y concentrado. Se agregaba agua con el objetivo de ajustar el contenido de materia seca de la dieta. La secuencia de suministro de la dieta fue tratamiento rojo, azul y verde y se respetó durante todo el posparto.

En la tabla 10 se resume la composición de los alimentos del concentrado postparto. Los alimentos del concentrado, al igual que en el preparto, se suministraron en forma de peleteado.

Tabla 10*Composición de los alimentos del concentrado posparto (base seca)*

Concentrado posparto	
Alimentos	Proporción (%)
Harina de soja	54
Afrechillo de trigo	15
Grano de maíz	15
Premezcla ^a	16

Nota. ^a Premezcla contiene sales minerales y el aditivo en los tratamientos MON y EXP.

En la tabla 11 se presenta la composición química de la RTM ofrecida para cada tratamiento. Los datos refieren al análisis de una muestra compuesta formada por las muestras tomadas durante el posparto.

Tabla 11*Composición química de la RTM para cada tratamiento (base seca)*

Análisis (%) ^b	Tratamiento ^a		
	CON	MON	EXP
MS	44,8	44,6	44,8
MO	89,9	91,3	90,7
PC	15,7	16,3	15,7
^a FDN _{mo}	21,8	27,1	23,5
FDA _{mo}	13,7	15,9	12,2

Nota. ^a Los tratamientos son control (CON), monensina (MON) y extractos de plantas (EXP). ^b Los análisis químicos realizados son contenido de materia seca (MS), materia orgánica (MO), proteína cruda (PC), fibra detergente neutro extraída con alfa amilasa y libre de cenizas (^aFDN_{mo}) y fibra detergente ácida libre de cenizas (FDA_{mo}).

3.6. Registros y Mediciones

Los muestreos ruminales se realizaron en los días -11±14 días; +33±14 días y +63±11 días en relación con la fecha promedio de parto (24/03/2022 ±12 días). Las tomas de muestra del líquido ruminal se realizaron durante dos días consecutivos a las 0, 4, 8, 16 y 24 horas posteriores al acceso a la alimentación. En cada tiempo de muestreo se tomó líquido ruminal con un dispositivo de extracción. Para cada una de las muestras se determinó el pH, concentración de AGV, concentración N-amoniaco y población de protozoarios.

3.6.1. pH Ruminal

La determinación de pH se realizó inmediatamente extraída la muestra con un medidor de pH portátil (EcoTestr pH2, Oakton, EE. UU.) que mide el pH en un rango de 0 a 14,0 (calibrado entre 0 – 7) con una apreciación de 0,1 unidades de pH.

3.6.2. Ácidos Grasos Volátiles

Una submuestra de 20 ml de cada muestra se conservó en un tubo de centrifugado (50ml) conteniendo 20ml de ácido orto-fosfórico al 85%. Las muestras fueron centrifugadas (5810R, Eppendorf, Alemania) por 10 minutos a 10.000 rpm y congeladas a -20 °C. Una vez terminado el tiempo se llenaron 3 criotubos de 2ml con pipeta Pasteur descartable (3ml) por cada muestra. Se conservaron a -20°C hasta el análisis. Se determinó la concentración de ácidos grasos volátiles mediante cromatografía de gases con un cromatógrafo Agilent modelo 8860, con inyección automática, detector FID (detector de ionización de llama), Columna: HPINNOWAX (0,53 μm * 30 m), usando como carrier nitrógeno y un detector de temperatura de 240°, en el laboratorio de nutrición de la Facultad de Agronomía.

3.6.3. Nitrógeno Amoniacal

Una submuestra de 20ml de cada muestra se conservó en un tubo de centrifugado (50ml) conteniendo 20ml de ácido sulfúrico 0.5 N y fueron congeladas

a -20°C. Al finalizar el experimento las muestras se centrifugaron siguiendo el mismo procedimiento descripto para los AGV. Una vez culminado el tiempo se llenó un tubo de 15ml. Se conservó a -20°C hasta su determinación en el laboratorio de nutrición de la Facultad de Agronomía en la sede EEMAC según Chaney y Marbach (1962).

3.6.4. Protozoarios

Una submuestra de 5ml de cada muestra se conservó en un tubo de centrifugado (15ml) conteniendo 5ml de formol al 10% según el procedimiento de Dehority (1984). Cada tubo se conservó a 4°C hasta el momento del conteo de protozoarios. Para el conteo se utilizó una cámara de Neubauer de doble retículo (Neubauer improved, Marienfeld Superior, Alemania) con una profundidad 0,1mm y una superficie del cuadrado más pequeño de 0,025 mm². La solución para observar se conformó por 1 ml de muestra (½ líquido ruminal y ½ formol) con 3 gotas de Lugol al 5% posteriormente diluidos en 9 ml de Glicerol al 30% con una espera de 15 minutos (Cedrola et al., 2015; D'Agosto & Carneiro, 1999). Las muestras se observaron con un microscopio óptico (CxL, Labomed, EE. UU.) con un aumento 10x (figura 3).

Figura 3

Materiales utilizados para realizar el conteo de protozoarios



Los protozoarios se contabilizaron en los 4 cuadrantes mayores de la grilla, realizando un recorrido visual por los 9 cuadrados interiores de cada uno. Se tomó el promedio de conteo en ambos lados de la cámara (cámara de doble retículo).

Para estimar la población de protozoarios se utilizó el siguiente cálculo:

$$\text{protozoarios/ml líq. ruminal} = \frac{\text{protozoarios contados}}{4 \text{ mm}^2 \cdot 0,1 \text{ mm} \cdot \frac{1}{20}} \cdot 10^3$$

Superficie contada 4 cuadrados = 4 x 1 mm² = 4 mm²

Profundidad de la cámara = 0,1 mm

Dilución 1:20 (1:2 con formol x 1:10 con glicerol)

Factor de conversión de mm^3 a $\text{ml} = 10^3$

3.7. Análisis Estadístico

Los datos obtenidos fueron analizados mediante un modelo de medidas repetidas en el tiempo, evaluándose independientemente preparto y posparto. Para esto, se utilizó un modelo mixto que incorporó el tratamiento, el período de muestreo, el tiempo de muestreo y sus interacciones como efectos fijos, mientras que la vaca fue considerada como un efecto aleatorio.

El modelo estadístico utilizado para el análisis fue el siguiente:

$$Y_{ijkl} = \mu + \tau_i + P_l + M_k(P_l) + \tau_i \cdot M_k(P_l) + \varepsilon_{ijkl}$$

$i = 1,2,3$
 $j = 1,2,3$
 $k = 1,2,3,4,5$
 $l = 1,2,3$
 con $\varepsilon_{ijkl} \text{ iid } \sim N(0; \sigma^2)$

Y_{ijkl} = representa la observación de la variable dependiente para la j -ésima vaca en el i -ésimo tratamiento, el l -ésimo período de muestreo y la k -ésima hora de muestreo

μ = media general de la variable dependiente

τ_i = efecto del i -ésimo tratamiento

P_l = efecto del l -ésimo período de muestreo

$M_k(P_l)$ = efecto de la k -ésimo tiempo de muestreo anidado al l -ésimo período de muestreo

$\tau_i \cdot M_k(P_l)$ = efecto de la interacción entre el i -ésimo tratamiento y el k -ésimo tiempo de muestreo de muestreo anidada al l -ésimo período de muestreo

ε_{ijkl} = error entre medidas repetidas y asociado a la variable aleatoria vaca

El análisis estadístico se realizó utilizando el paquete estadístico SAS (SAS OnDemand for Academics, SAS Institute Inc.). Las variables dependientes analizadas fueron pH, AGVt, C2, C3, C4, rel. C2:C3, N-amoniaco y protozoarios. La separación de medias se realizó mediante test de Tukey, considerando un nivel de significancia de $p < 0,05$. Los valores se reportan como medias de mínimos cuadrados y su error estándar.

4. Resultados

4.1. Preparto

En la tabla 12 se presentan los resultados de las mediciones realizadas en el preparto (-11 ± 14 días respecto a la fecha promedio de parto).

Tabla 12

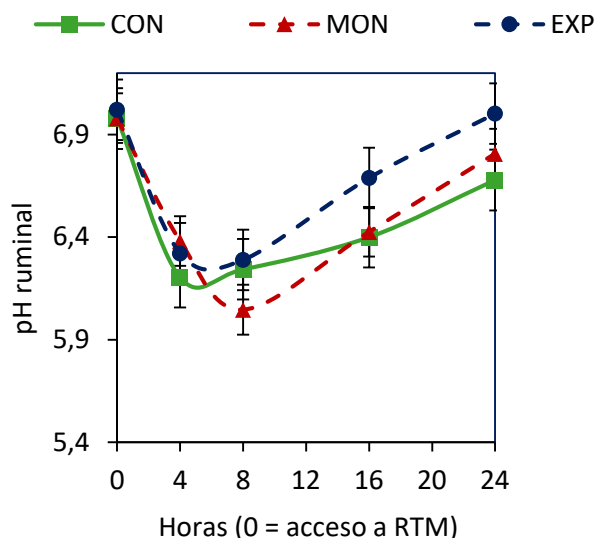
Efecto de la adición de monensina y extractos de plantas sobre parámetros ruminales y población de protozoarios durante el preparto

Ítem	Tratamiento				p-valor		
	CON	MON	EXP	EE	T	M	T x M
pH ruminal	6,5	6,5	6,7	0,07	0,19	<,0001	0,83
N-NH ₃ (mg/L)	101,0	101,2	77,3	9,70	0,14	0,20	0,36
AGVt (mmol/L)	91,5	94,8	103,2	7,95	0,57	0,33	0,99
Acético (%)	62,9	64,7	61,1	1,56	0,24	0,12	0,96
Propiónico (%)	23,2	23,1	22,2	0,89	0,63	0,40	0,77
Butírico (%)	11,1	11,0	11,6	0,97	0,88	0,07	0,98
Rel. C2/C3	2,7	2,9	2,7	0,18	0,64	0,32	0,99
Protozoarios ($\times 10^4$ cel./mL)	12,3a	6,7b	8,3b	1,35	0,008	0,009	0,88

Nota. CON: control. MON: monensina. EXP: extracto de plantas. EE: error estándar de la media (se presenta el mayor de los 3 tratamientos). N-NH₃: concentración de nitrógeno amoniacal. AGVt: concentración de ácidos grasos volátiles totales. Rel. C2/C3: relación acético/propiónico. T: tratamiento. M: tiempo de muestreo. Letras distintas representan diferencias significativas entre los tratamientos.

4.1.1. pH Ruminal

No hubo un efecto significativo del tratamiento, ni de la interacción tratamiento x tiempo de muestreo, sobre el pH ruminal (6,6 en promedio). Sin embargo, el tiempo de muestreo sí tuvo un efecto significativo sobre el pH ruminal ($p < 0,01$). En la figura 4 se presenta la dinámica del pH ruminal a lo largo del día en los muestreos realizados durante el preparto.

Figura 4*Dinámica diaria del pH ruminal durante el parto*

Nota. RTM: ración total mezclada. CON: control. MON: monensina. EXP: extracto de plantas. Las barras de error representan el error estándar de la media.

4.1.2. Nitrógeno Amoniacal y Ácidos Grasos Volátiles

No hubo efecto del tratamiento ni del tiempo de muestreo sobre la concentración total de AGV, C2, C3, C4, rel. C2/C3, N-amoniacal (gráfica en Apéndice B). Tampoco existió efecto de la interacción tratamiento x tiempo (tabla 12).

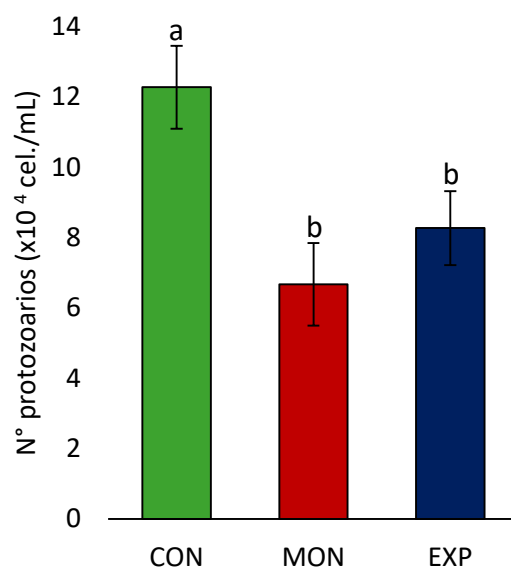
4.1.3. Protozoarios

El tratamiento tuvo un efecto significativo sobre la población de protozoarios ($p=0,008$;). En el tratamiento CON (media 12×10^4 cel./mL) se observó una mayor población de protozoarios en comparación a los tratamientos MON y EXP (promedio 7×10^4 cel./mL; reducción de 39% con relación al CON).

En todos los tiempos de muestreo, el tratamiento CON mostró valores superiores, mientras que en el tratamiento MON mostró los valores más bajos, excepto en el tiempo 16 (figura 5). Además, se encontraron diferencias significativas entre los tiempos de muestreo ($p=0,009$); sin embargo, no se encontró una interacción significativa entre los tiempos de muestreo y los tratamientos aplicados.

Figura 5

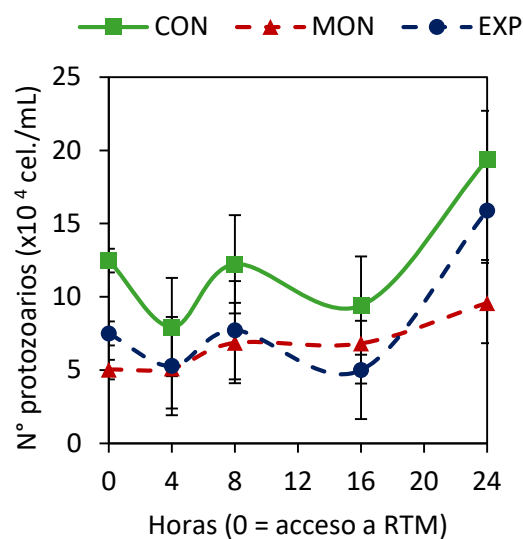
Población de protozoarios según tratamiento en el parto



Nota. CON: control. MON: monensina. EXP: extracto de plantas. Las barras de error representan el error estándar de la media. Letras distintas representan diferencias significativas entre los tratamientos.

Figura 6

Dinámica diaria de la población de protozoarios durante el parto



Nota. RTM: ración total mezclada. CON: control. MON: monensina. EXP: extracto de plantas. Las barras de error representan el error estándar de la media.

4.2. Posparto

En la tabla 13 se presentan los resultados de las mediciones realizadas en el posparto ($+33\pm 14$ días y $+63\pm 11$ días respecto a la fecha promedio de parto).

Tabla 13*Parámetros ruminales y población de protozoarios durante el posparto*

Ítem	Tratamiento				p-valor				
	CON	MON	EXP	EE	T	M (Per)	Per	T x Per	T x M (Per)
pH ruminal	6,50	6,53	6,66	0,03	0,9	<,0001	<,0001	0,04	0,01
N-amoniaco (mg/L)	89,35a	82,01a	65,75b	2,80	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001
AGVt (mmol/L)	120,5	109,7	108,9	4,28	0,09	<,0001	0,95	0,03	0,91
Acético (%)	60,9	61,1	60,9	0,96	0,96	<,0001	0,70	0,005	0,99
Propiónico (%)	24,3	25,2	26,1	0,66	0,08	0,196	0,14	0,019	0,99
Butírico (%)	12,3a	11,6a	10,5b	0,28	0,0001	<,0001	0,006	0,50	0,61
Rel. C2/C3	2,6	2,5	2,4	0,07	0,25	0,04	0,48	0,02	0,99
Protozoarios (x10 ⁴ cel/mL)	11,5a	7,1b	4,0b	1,1	<,0001	0,6194	0,015	0,1709	0,9967

Nota. CON: control. MON: monensina. EXP: extracto de plantas. EE: error estándar de la media (se presenta el mayor de los 3 tratamientos).

N-NH₃: concentración de nitrógeno amoniacal. AGVt: concentración de ácidos grasos volátiles totales. Rel. C2/C3: relación

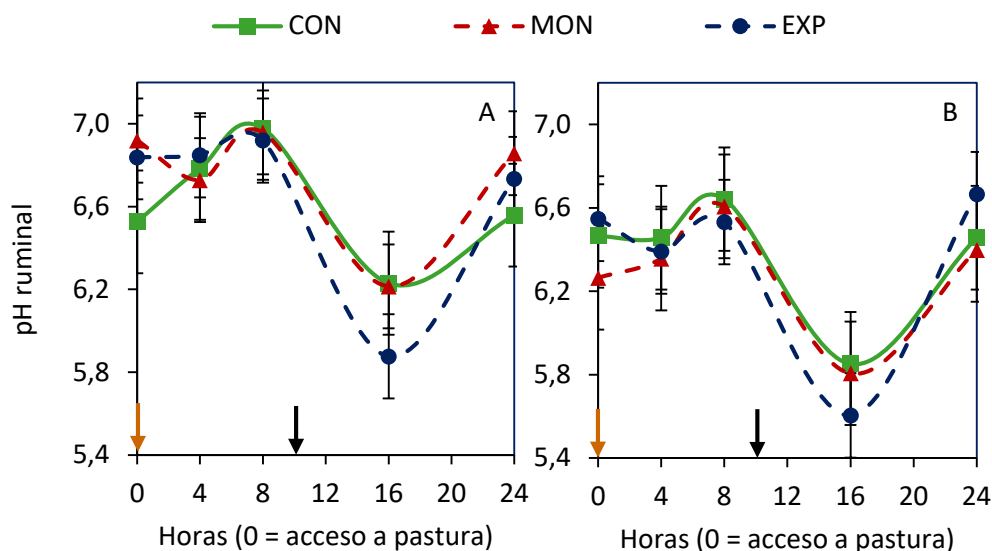
acético/propiónico. T: tratamiento. M: tiempo de muestreo. Letras distintas representan diferencias significativas entre los tratamientos.

4.2.1. pH Ruminal

No hubo efecto significativo del tratamiento sobre el pH ruminal (6,5, en promedio). Sin embargo, el período de muestreo ($p<0,01$) y el tiempo de muestreo ($p<0,01$) si tuvieron un efecto significativo sobre el pH ruminal (tabla 13). La interacción tratamiento x período de muestreo y tratamiento x tiempo anidado al período de muestreo ($p<0,01$) también tuvieron un efecto significativo. En la figura 7 se presenta la dinámica del pH ruminal a lo largo del día para los dos períodos analizados durante el posparto.

Figura 7

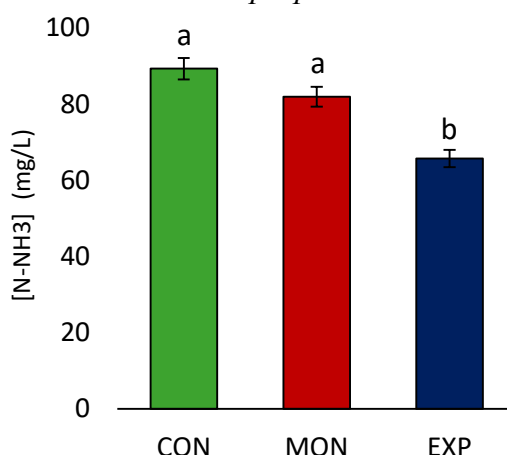
Dinámica del pH ruminal durante el posparto



Nota. Panel A: período +30 días posparto. Panel B: período +60 días posparto. La flecha en la hora cero indica el momento de acceso a la pastura y la flecha negra el momento de acceso a la RTM. Las barras de error representan el error estándar de la media.

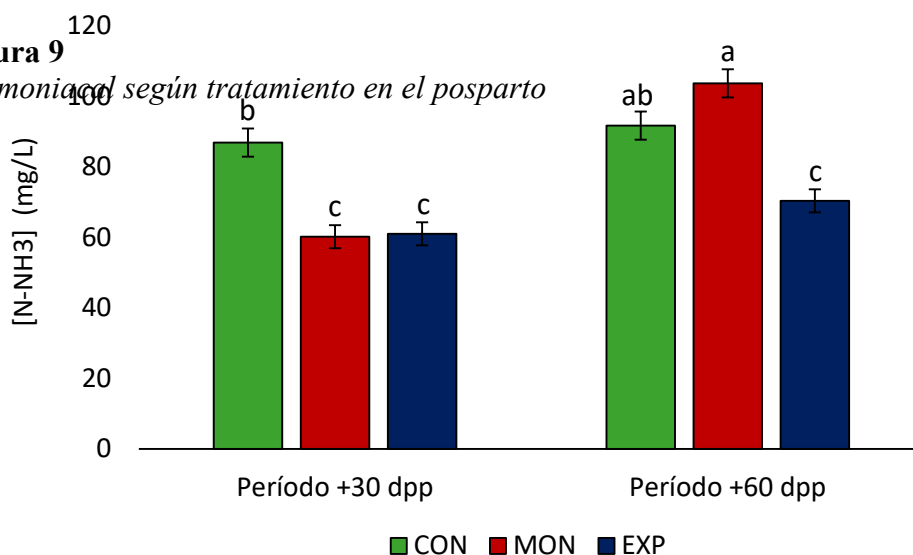
4.2.2. Nitrógeno Amoniacal

Hubo efecto significativo del tratamiento sobre la concentración de N-amoniaco ($p<0,0001$; figura 8), también del período de muestreo y del tiempo de muestreo, como de las interacciones entre ellos y el tratamiento (tratamiento x período de muestreo y tratamiento x tiempo de muestreo; $p<0,0001$ para todos los efectos).

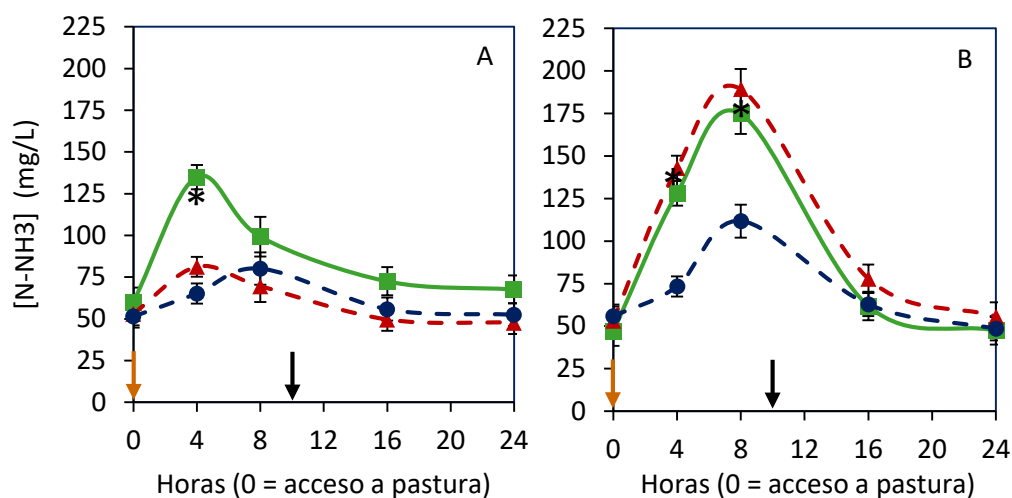
Figura 8*N-amoniaco según tratamiento en el posparto*

Nota. CON: control. MON: monensina. EXP: extracto de plantas. Las barras de error representan el error estándar de la media. Letras distintas representan diferencias significativas entre los tratamientos.

El grupo CON mostró una mayor concentración de N-amoniaco durante todo el período +30 días posparto que los tratamientos MON y EXP, encontrándose muy similares estos dos tratamientos. Sin embargo, durante el período +60 días posparto, el grupo CON y MON siguen un patrón similar, teniendo ambos concentraciones más elevadas de N-amoniaco que el grupo EXP (figura 9). Esta diferencia se acentúa entre las 4 y 8 horas posteriores al acceso a la pastura (figura 10).

Figura 9
N-amoniaco según tratamiento en el posparto

Nota. CON: control. MON: monensina. EXP: extracto de plantas. Las barras de error representan el error estándar de la media. Letras distintas representan diferencias significativas entre los grupos.

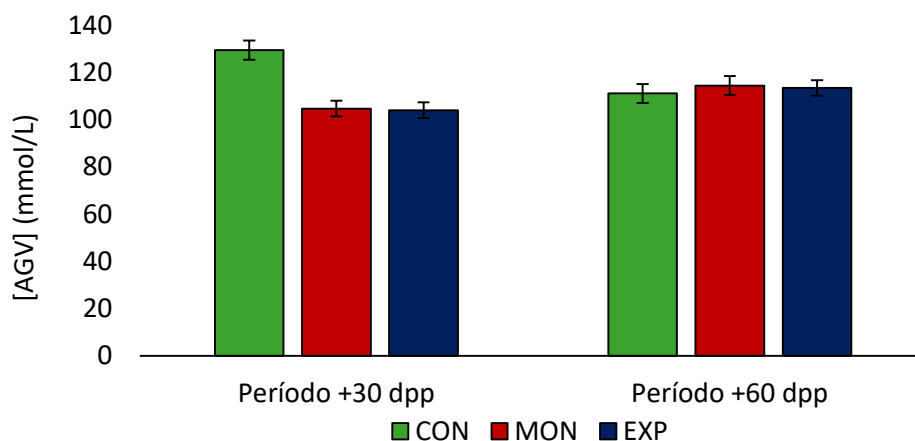
Figura 10*Dinámica diaria del N-amoniaco durante el posparto*

Nota. Panel A: período +30 días posparto. Panel B: período +60 días posparto. La flecha en la hora cero indica el momento de acceso a la pastura y la flecha negra el momento de acceso a la RTM. Las barras de error representan el error estándar de la media. Los asteriscos indican que existe al menos una diferencia significativa entre los tratamientos.

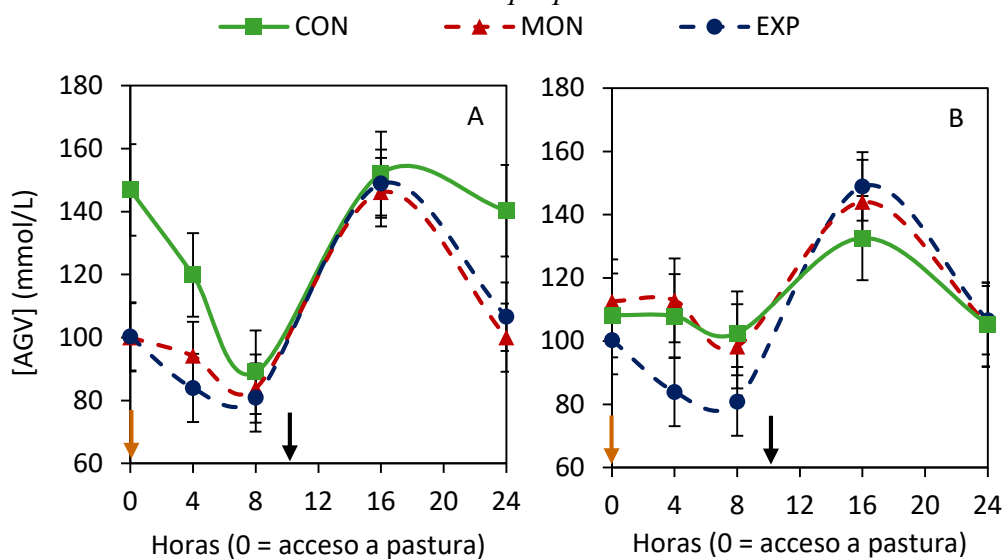
En el período +30 días posparto, el momento de mayor concentración de N-amoniaco fue a las 4 horas de acceso a la pastura para los grupos CON y MON y a las 8 horas para el grupo EXP. En el período +60 días posparto, este momento fue a las 8 horas para los tres grupos.

4.2.3. Ácidos Grasos Volátiles

4.2.3.1. AGV Totales. No hubo un efecto significativo del tratamiento ($p=0.09$; figura 11), ni del período de muestreo, ni de la interacción tratamiento x tiempo anidado al período ($p=0.91$), sobre la concentración de AGVt (109mmol/L en promedio). Existió efecto del tiempo de muestreo ($p<.0001$; figura 12) y de su interacción con el período ($p=0.03$) sobre la concentración de AGVt.

Figura 11*AGV totales según tratamiento en el posparto*

Nota. CON: control. MON: monensina. EXP: extracto de plantas. Las barras de error representan el error estándar de la media. No se presentan las letras dado que el efecto del tratamiento no fue significativo.

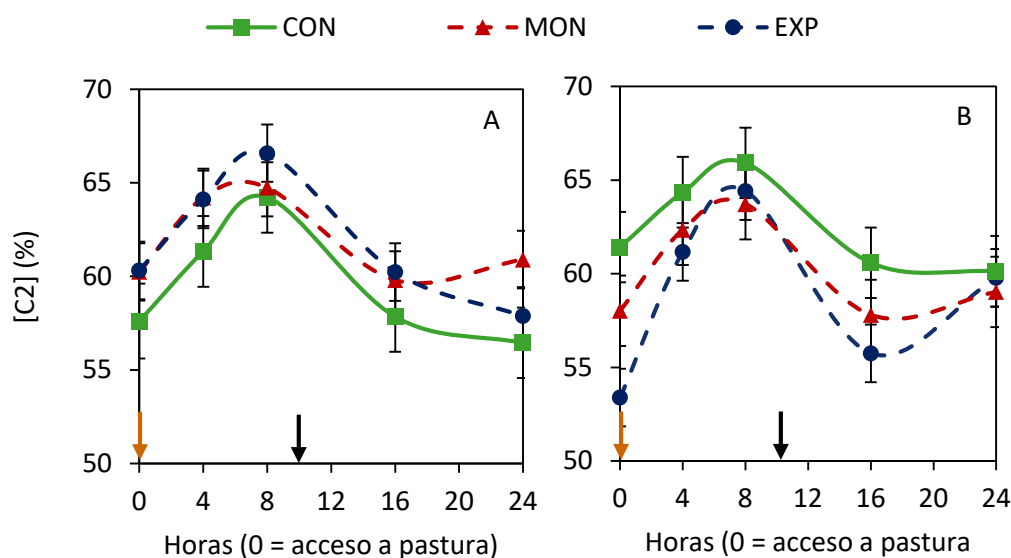
Figura 12*Dinámica diaria de los AGVt durante el posparto*

Nota. Panel A: período +30 días posparto. Panel B: período +60 días posparto. La flecha en la hora cero indica el momento de acceso a la pastura y la flecha negra el momento de acceso a la RTM. Las barras de error representan el error estándar de la media.

4.2.3.2. Ácido Acético. No hubo un efecto significativo del tratamiento, del período de muestreo, ni de la interacción tratamiento x tiempo anidado al período de muestreo, sobre el porcentaje de C2 (61% en promedio). Sin embargo, el tiempo de muestreo sí tuvo un efecto significativo sobre el porcentaje de C2 ($p < .0001$). La interacción tratamiento x período de muestreo fue significativa ($p = 0.005$), observándose que durante el período +30 días posparto en el grupo CON se registró un menor porcentaje de C2 en relación con los otros tratamientos, mientras que en el período +60 días posparto se invirtió este resultado, siendo el grupo CON el de mayor porcentaje de C2 (figura 13).

Figura 13

Dinámica diaria del ácido acético durante el posparto

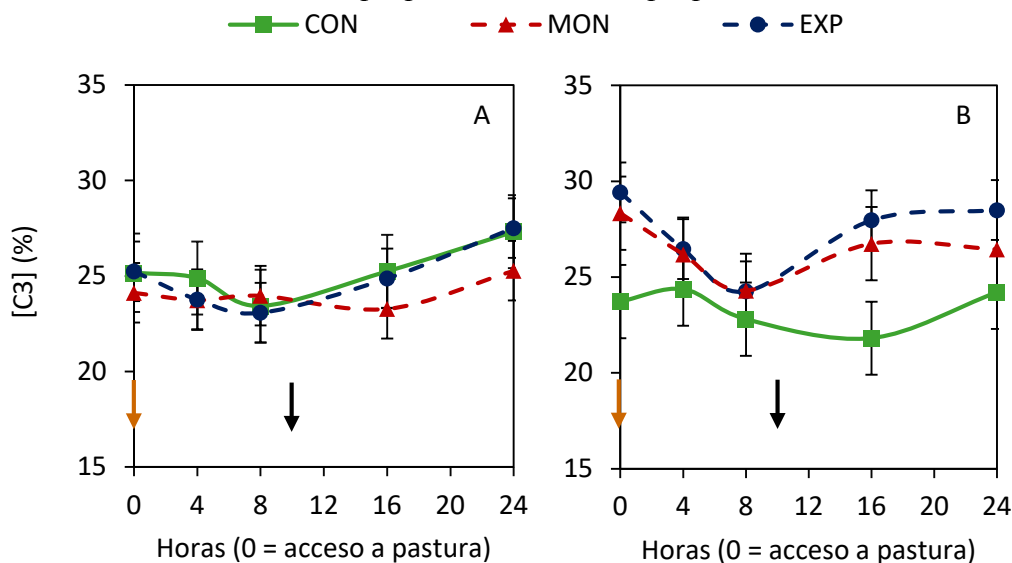


Nota. Panel A: período +30 días posparto. Panel B: período +60 días posparto. La flecha en la hora cero indica el momento de acceso a la pastura y la flecha negra el momento de acceso a la RTM. Las barras de error representan el error estándar de la media.

4.2.3.3. Ácido Propiónico. No hubo un efecto significativo del tratamiento, aunque existió tendencia al aumento en los tratamientos MON y EXP ($p = 0.08$). Tampoco hubo efecto del tiempo de muestreo ni del período de muestreo sobre el porcentaje de C3 (25% en promedio; figura 14). Sin embargo, la interacción tratamiento x período de muestreo fue significativa ($p = 0.02$). Los tratamientos tuvieron un comportamiento similar en el período +30 días posparto, mientras que en el período +60 días posparto se observa un mayor porcentaje de C3 en los grupos MON y EXP pero sin diferencias significativas con el grupo CON.

Figura 14

Dinámica diaria del ácido propiónico durante el posparto

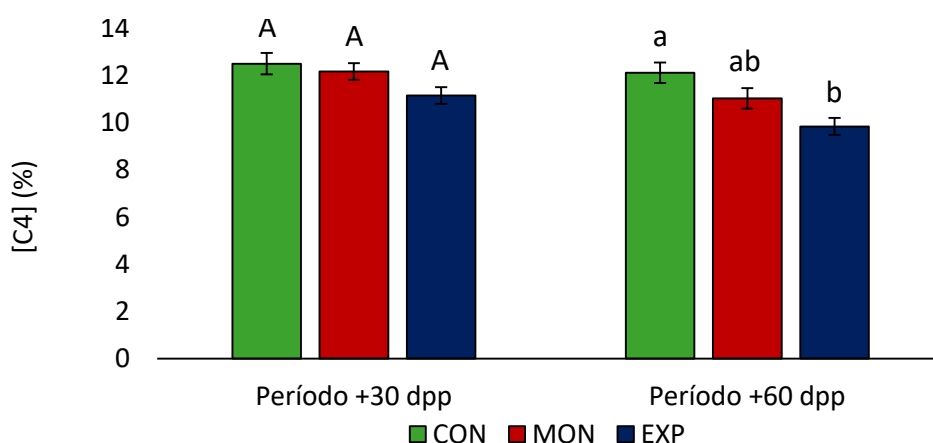


Nota. Panel A: período +30 días posparto. Panel B: período +60 días posparto. La flecha en la hora cero indica el momento de acceso a la pastura y la flecha negra el momento de acceso a la RTM. Las barras de error representan el error estándar de la media.

4.2.3.4. Ácido Butírico. Existió un efecto significativo del tratamiento ($p=0.0001$), del tiempo de muestreo ($p<.0001$) y del período de muestreo ($p=0.006$) sobre el porcentaje de C4 (promedio 11%). Sin embargo, las interacciones tratamiento x período y tratamiento por tiempo anidado al período no fueron significativas.

Figura 15

Porcentaje de ácido butírico según tratamiento en el posparto



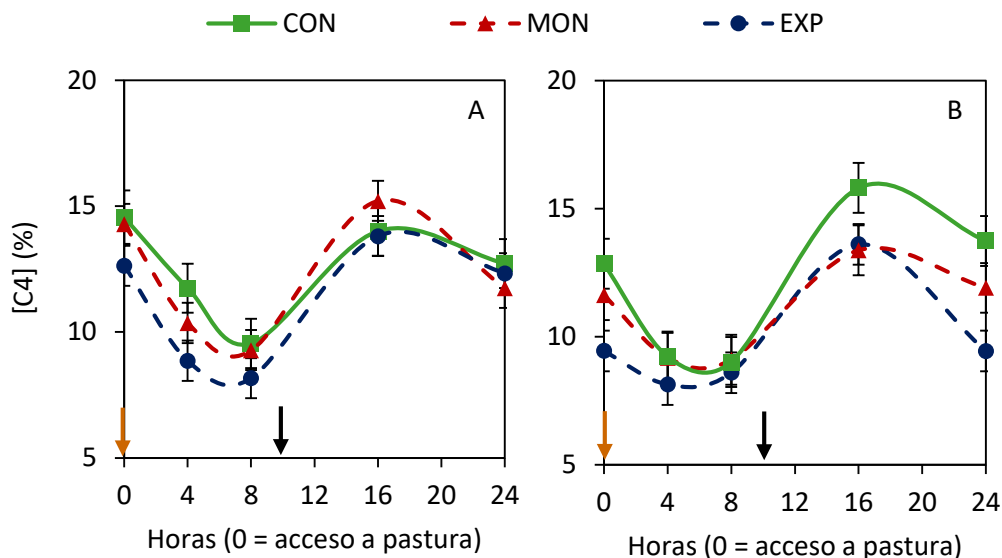
Nota. CON: control. MON: monensina. EXP: extracto de plantas. Las barras de error representan el error estándar de la media. Letras distintas representan diferencias significativas entre los grupos, letras mayúsculas, dentro del período +30 dpp y minúsculas período +60 dpp.

En el período +60 días posparto se observa un menor porcentaje de C4 en el grupo EXP y MON, pero este último sin diferencia significativa con el grupo CON (figura 15).

El momento de menor porcentaje de C4 fue a las 8 horas de acceso a la pastura y el máximo se dio a las 16 horas para todos los grupos (figura 16).

Figura 16

Dinámica diaria del porcentaje de ácido butírico durante el posparto

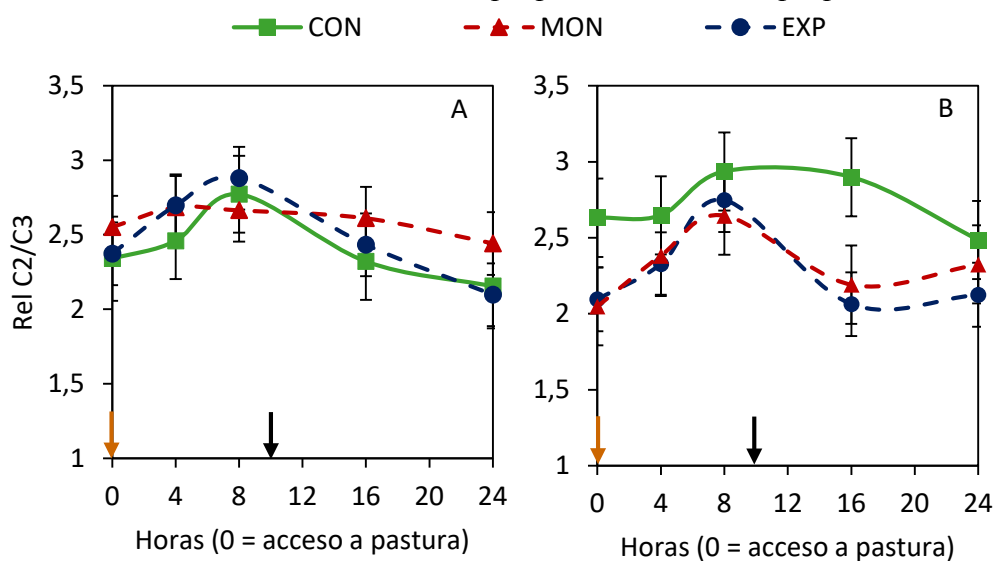


Nota. Panel A: período +30 días posparto. Panel B: período +60 días posparto. La flecha en la hora cero indica el momento de acceso a la pastura y la flecha negra el momento de acceso a la RTM. Las barras de error representan el error estándar de la media.

4.2.3.5. Relación C2/C3. No hubo un efecto significativo del tratamiento, del período de muestreo, ni de la interacción tratamiento x tiempo anidado al período sobre la relación C2/C3 (2,47 en promedio; figura 17). Sin embargo, hubo una interacción significativa entre el tratamiento y el período de muestreo ($p=0,02$).

Figura 17

Dinámica diaria de la relación acético/propiónico durante el posparto



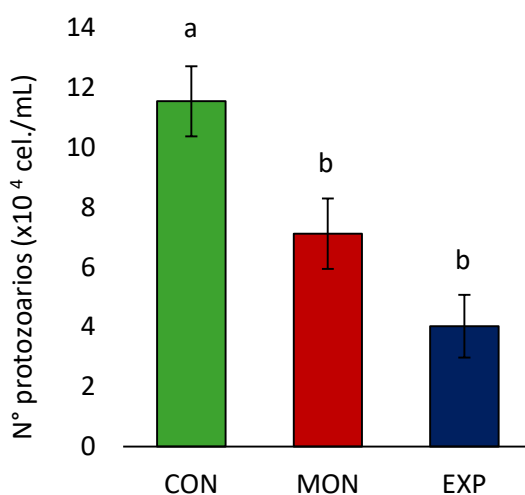
Nota. Panel A: período +30 días posparto. Panel B: período +60 días posparto. La flecha en la hora cero indica el momento de acceso a la pastura y la flecha negra el momento de acceso a la RTM. Las barras de error representan el error estándar de la media.

4.2.4. Protozoarios

El tratamiento tuvo un efecto significativo sobre la población de protozoarios ($p < 0,0001$). En el tratamiento CON se observó la mayor población de protozoarios y en el tratamiento EXP la menor (figura 18). La reducción en el tratamiento MON fue de 38% y en el tratamiento EXP fue de 65%, en relación al tratamiento control.

Figura 18

Población de protozoarios según tratamiento durante el posparto

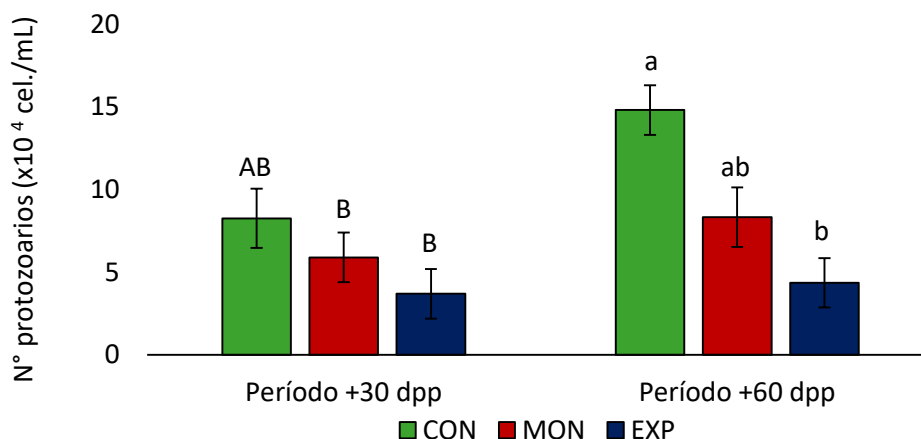


Nota. CON: control. MON: monensina. EXP: extracto de plantas. Las barras de error representan el error estándar de la media. Letras distintas representan diferencias significativas entre los tratamientos.

También existió efecto del período ($p=0,015$; figura 19), pero no de la interacción tratamiento x período, tratamiento x tiempo anidado al período, ni del tiempo dentro de cada período.

Figura 19

Población de protozoarios según tratamiento por período en el posparto

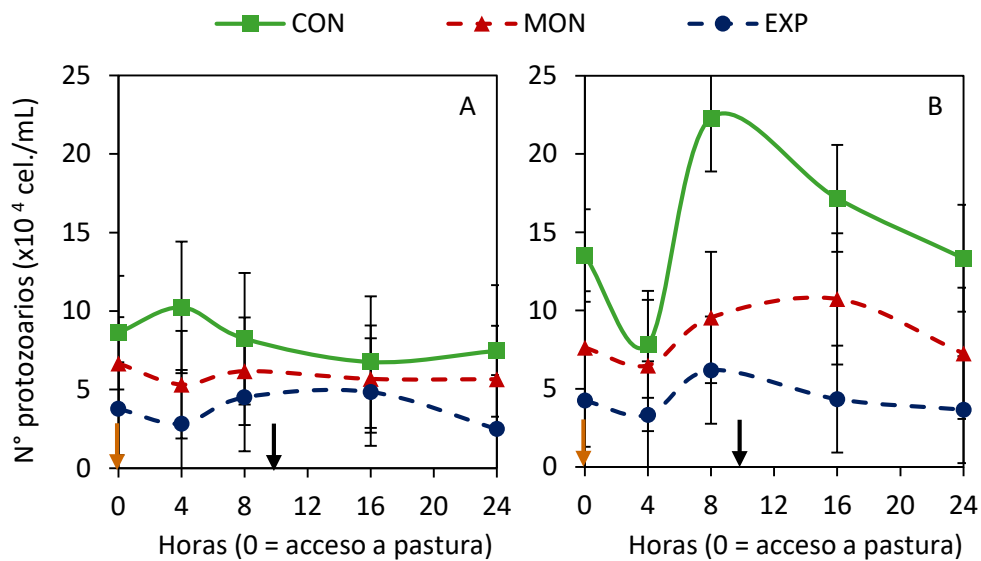


Nota. CON: control. MON: monensina. EXP: extracto de plantas. Las barras de error representan el error estándar de la media. Letras distintas representan diferencias significativas entre los grupos, letras mayúsculas, dentro del período +30 dpp y minúsculas período +60 dpp

En el período +30 días posparto no hubo un efecto significativo del tratamiento, el promedio de la población de protozoarios fue de 6×10^4 cel./mL. Sin embargo, en el período +60 días posparto si se detectaron diferencias significativas. El grupo CON mostró valores superiores (sin diferencias con el grupo MON), y los grupos MON y EXP no se diferenciaron (figura 18) promedio de MON y EXP de 6×10^4 cel./mL, representa una reducción de 57% respecto al CON). Además, se encontraron diferencias significativas entre los tiempos de muestro ($p=0,009$); sin embargo, no se encontró una interacción significativa entre los tiempos de muestreo y los tratamientos aplicados (figura 20).

Figura 20

Dinámica diaria de la población de protozoarios durante el posparto



Nota. Panel A: período +30 días posparto. Panel B: período +60 días posparto. La flecha en la hora cero indica el momento de acceso a la pastura y la flecha negra el momento de acceso a la RTM. Las barras de error representan el error estándar de la media.

5. Discusión

5.1. pH Ruminal

El promedio del pH observado fue de 6,56 tanto en el preparto como en el posparto. Este valor se encuentra dentro de los valores esperados de pH ruminal para vacas lecheras en pastoreo con suplementación (Bargo et al., 2003).

En relación con la dinámica diaria del pH, las curvas obtenidas durante el preparto se comportan acorde a lo esperado. Se observa una reducción del mismo luego de la hora 0 correspondiente al acceso de los animales a la TMR, por la producción de ácidos grasos volátiles como consecuencia de la fermentación de los carbohidratos solubles durante la ingesta (Owens & Goetsch, 1988). Luego de alcanzar un mínimo entre las 4 y 8 hs post acceso al alimento, el pH ruminal comienza a subir lentamente por una menor tasa de producción de AGV y por la llegada de tampones (fosfatos y bicarbonato) procedentes de la saliva (Yokoyama & Johnson, 1988).

Lo observado durante el posparto en las primeras horas de muestreo, coincide con lo reportado por Mattiauda et al. (2013), donde el ingreso a la pastura en horas tempranas determina un bajo contenido de carbohidratos en el forraje, por lo que no se espera una rápida reducción del pH, sumado a una posible tasa de consumo relativamente lenta por el estado fisiológico del animal y el hambre del animal (alimentación *ad libitum*). A partir de la hora 8, donde los animales pasan a ser alimentados en el corral, la curva es comparable con la curva preparto. En la hora 16, donde se obtuvieron los menores registros de pH, los animales ya estaban consumiendo la RTM, lo que explica el rápido y máximo descenso.

En general, los trabajos consultados coinciden en que no hay efecto del tratamiento sobre el pH, tanto para los extractos de planta (Benchaar, 2020; Elcoso et al., 2019; Olijhoek et al., 2019) como para la monensina (Drong et al., 2016; Mathew et al., 2011; Schären et al., 2017). Estos trabajos se caracterizan por evaluar ambos aditivos en dietas de vacas lecheras en lactancia media en sistemas confinados. En Argentina, se evaluó una mezcla de extractos de plantas en vacas lecheras en lactancia media en sistemas mixtos (Flores et al., 2013); en el mismo tampoco se encontraron efectos significativos de los extractos de plantas sobre el pH ruminal.

5.2. Nitrógeno Amoniacal

El promedio del N-amoniaco observado fue de 93 mg/l y 79 mg/l en el preparto y en el posparto respectivamente. Estos valores son mayores al óptimo para la función ruminal (Rearte, 1993) pero son menores al promedio de N-amoniaco reportado para vacas lecheras en pastoreo con suplementación (Bargo et al., 2003).

En el período preparto, si bien los tratamientos no tuvieron efecto significativo sobre la concentración de N-amoniaco, se puede observar un patrón

con picos menos pronunciados en MON y EXP respecto al CON. Además, mientras que los primeros dos alcanzan su máximo entre el tiempo 4 y 8, y el mínimo en el tiempo 16, el CON alcanza su máximo en el tiempo 4 y el mínimo en el tiempo 8. Esto podría estar indicando una mayor estabilidad de N-amoniaco en los grupos MON y EXP, lo que sería favorable para el funcionamiento ruminal.

Durante el posparto, los extractos de plantas redujeron un 26% el N-amoniaco respecto al tratamiento control. Este resultado es similar a los reportados por Kholif et al. (2021), Lin et al. (2013), Matloup et al. (2017). En estos trabajos la reducción del N-amoniaco por la utilización de extractos de plantas fue del 22% en promedio. Esto puede deberse a que la acción inhibitoria sobre las bacterias HAP disminuye la desaminación (McIntosh et al., 2003) y, además, otras bacterias podrían ocupar el nicho de aquellas afectadas por el aditivo, aumentando el uso del N-amoniaco para la síntesis de proteína microbiana. También podría explicarse por una reducción en la población de protozoarios dado que están implicados en la degradación de las proteínas de los alimentos en el rumen (Jouany, 1996) y por la capacidad de los compuestos fenólicos de formar complejos con las proteínas evitando su degradación.

Durante el posparto, la monensina redujo un 8% el N-amoniaco respecto al tratamiento control. Sin embargo, no se detectaron diferencias significativas entre el tratamiento con monensina y el tratamiento control. Benchaar et al. (2006) reportaron una reducción de N-amoniaco del 6% y atribuyen este efecto a una reducción de la población de bacterias productoras de amoníaco.

En contraposición, otros autores no encuentran diferencias en la concentración de N-amoniaco en rumen por el uso de extractos de plantas (Benchaar, 2020; Elcoso et al., 2019; Olijhoek et al., 2019) y monensina (Do Prado et al., 2015; Erasmus et al., 2005; Mezzetti et al., 2019). Lo que podría atribuirse a la etapa de lactancia con la que se realizan los experimentos, la dieta suministrada y al tipo de compuesto utilizado en el caso de los extractos de plantas.

Las concentraciones de N-amoniaco fueron menores en el período +30 días posparto que en el período +60 días posparto. Esto podría explicarse debido a la depresión del consumo de materia seca en el período de transición (Drackley, 1999). Esta reducción del CMS se expresa particularmente en la pastura, ya que las vacas en lactancia temprana pastorean un corto período de tiempo con relación al tiempo permitido y, además, a una baja tasa de consumo, determinando un pastoreo lento y selectivo (Chilibroste et al., 2012). El menor CMS determina una menor disponibilidad de proteína a nivel ruminal y por lo tanto una menor concentración de amoníaco (McDonald et al., 2022). Además, podría deberse a diferencias en el comportamiento alimentario, competencia con otras actividades y estrés entre ambos períodos.

En el período +30 días posparto el punto máximo de concentración de N-amoniaco fue mayor para el tratamiento control que para los tratamientos con aditivos. En el período +60 días posparto el tratamiento con monensina se comportó

de la misma forma que el control y el tratamiento con extractos continuó siendo menor. Este efecto podría deberse a una disminución del efecto de la monensina causada por una adaptación de la microbiota ruminal a este compuesto (Melchior et al., 2018). En el caso de los extractos de plantas, aunque se han reportado adaptaciones de la microbiota, se trata de una mezcla de compuestos bioactivos que debido a sus diversos mecanismos de acción podrían haber permitido la continuidad del efecto.

5.3. Ácidos Grasos Volátiles

Durante el posparto, a pesar de no encontrar diferencias en la concentración de AGV totales, los grupos suplementados con aditivos disminuyeron un 9-10% con respecto al control. La ausencia de efecto coincide con la mayoría de los trabajos consultados tanto de monensina (Mezzetti et al., 2019; Schären et al., 2017; Silva et al., 2021) como de extractos de plantas (Benchaa, 2020; Elcoso et al., 2019; Olijhoek et al., 2019). Se han reportado disminuciones de hasta un 6% en la concentración de AGV totales por el uso de monensina (Prange et al., 1978) o de extractos de plantas (Dschaak et al., 2011; Lin et al., 2013). Otros autores, sin embargo, han reportado aumento en la concentración de AGV habiendo suplementado con extractos de plantas (Chaves et al., 2008b; Kholif et al., 2018, 2021; Soltan et al., 2018). La disminución en la concentración de AGV se puede atribuir a altas dosis que determinan una menor digestibilidad ruminal (Lin et al., 2013) y/o a un menor consumo de forraje (Dschaak et al., 2011).

En cuanto a los AGV individuales, los resultados encontrados y su coincidencia con los trabajos consultados fueron variables. El promedio de C2 observado en el posparto es 61% respecto al total de AGV, lo que se encuentra dentro de los valores reportados para vacas lecheras en pastoreo con suplementación (52 – 89 %; Bargo et al., 2003). La ausencia de efecto de los aditivos sobre el porcentaje de C2 coincide con la mayoría de los trabajos consultados tanto de monensina (Mezzetti et al., 2019; Schären et al., 2017; Silva et al., 2021) como de extractos de plantas. Sin embargo, existen trabajos que reportan menores porcentajes de C2 como respuesta al uso de monensina (Dinius et al., 1976; Granzin & Dryden, 1999; Newbold et al., 1993; Prange et al., 1978; Stahringer et al., 2012) y extractos de plantas (Cardozo et al., 2006; Da Silva et al., 2020; Klop et al., 2017; Mohammed et al., 2004; Yang et al., 2010), lo que podría explicarse por una inhibición de las bacterias Gram positivas, productoras de C2 entre otros productos finales (Russell & Houlihan, 2003).

El uso de MON y EXP tampoco tuvo efecto en la proporción de C3, que resultó en un promedio en el posparto de 25% sobre el total de AGV, lo que se encuentra dentro de los valores consultados (19 – 26%; Bargo et al., 2003). Sin embargo, se observó una tendencia ($p=0.08$) a aumentar la proporción de C3 por el uso de estos aditivos, que se expresó particularmente en el período +60 días posparto. Esta tendencia coincide con la mayoría de los trabajos que evaluaron el efecto de la monensina, encontrando un aumento en el porcentaje de C3 (Do Prado

et al., 2015; Drong et al., 2016; Schären et al., 2017). Para el caso de los extractos de plantas, en la mayoría de los estudios no se encontraron diferencias en el porcentaje de C3 (Benchaa, 2020; Ghizzi et al., 2018; Olijhoek et al., 2019). Otros trabajos encontraron un aumento de la proporción de C3 por el uso de estos aditivos (Da Silva et al., 2020; Kholif et al., 2018, 2021; Lin et al., 2013; Soltan et al., 2018). Este efecto podría asociarse a la inhibición de bacterias Gram positivas que son productoras de C2, C4 e hidrógeno (Russell & Houlihan, 2003) mediante la alteración del transporte de iones a través de las membranas (Bretschneider, 2009). Además, las bacterias Gram negativas (productoras de propionato) podrían ocupar el nicho que dejan aquellas afectadas por los aditivos y de esta forma aumentar la producción de C3 (Bodas et al., 2012).

El C4 fue el único AGV, de los evaluados, que fue afectado por los aditivos. El promedio observado en el posparto es 11%, lo que se encuentra dentro de los valores reportados (11 -19%; Bargo et al., 2003). Si bien en ambos períodos el tratamiento CON fue el que obtuvo los mayores valores, se observaron diferencias significativas únicamente con el tratamiento EXP y durante el período +60 días posparto (fig 15). Esta reducción del porcentaje de C4 en el tratamiento EXP coincide con los resultados encontrados por algunos autores (Cieslak et al., 2012; Kholif et al., 2017, 2018, 2021; Lin et al., 2013). Sin embargo, cabe señalar que la mayoría de los trabajos no encontraron diferencias significativas y que, incluso, algunos reportaron un aumento en el porcentaje de C4 (Soltan et al., 2018). Para el caso de monensina, la ausencia de efecto coincide con la mayoría de los resultados revisados (Mezzetti et al., 2019; Schären et al., 2017; Silva et al., 2021).

5.4. Protozoarios

La población de protozoarios tanto en el preparto (9×10^4 cel./mL) como en el posparto (8×10^4 cel./mL) se encuentra dentro del rango de valores esperados (Huws et al., 2020).

En la mayoría de los estudios *in vivo* analizados no se determinó el efecto de monensina (Drong et al., 2016; Mezzetti et al., 2019; Silva et al., 2021) ni de los extractos de plantas (Elcoso et al., 2019; Kholif et al., 2021; Olijhoek et al., 2019) sobre la población de protozoarios y, en los que lo evaluaron, en su mayoría, no se encontraron efectos significativos.

En el caso de monensina, 6 estudios del total de trabajos consultados determinaron el valor de la población de protozoarios y de estos solo uno reportó efecto sobre la población de protozoarios en ovejas, reduciéndose un 54% con el uso de este aditivo (Newbold et al., 1993). Este resultado coincide con los resultados del presente estudio; en el preparto una reducción de 46% del tratamiento con monensina en relación con el control y en el posparto una reducción promedio de 38% del tratamiento con monensina en relación con el control.

En relación a los extractos de plantas, 11 estudios del total de trabajos consultados determinaron el valor de la población de protozoarios y de estos hubo

4 estudios que encontraron efecto de los extractos de plantas sobre la población de protozoarios; dos fueron evaluando ovinos suplementados con una mezcla de aceites esenciales compuesta por aceite de clavo, canela, orégano y limón (Lin et al., 2013) o cinnamaldehído, eugenol, carvacrol y oleorresina de *Capsicum* sp. (Soltan et al., 2018), uno con aceite de anís en vaquillonas (Cardozo et al., 2006) y otro, taninos en vacas lecheras (Cieslak et al., 2012). Cieslak et al. (2012) reportan una reducción de la población de protozoarios de 35% por la suplementación con taninos. Este resultado coincide con los resultados del presente estudio; en el preparto hubo una reducción de 33% del tratamiento con extractos de plantas en relación con el control y en el posparto se encontró una reducción promedio de 65% del tratamiento con extractos de plantas en relación con el control.

Este efecto en la población de protozoarios podría ser benéfico en el resultado de la fermentación ruminal, ya que resultaría en un aumento del flujo de proteína microbiana al duodeno por menor depredación de bacterias que da lugar a mayor biomasa bacteriana (Huws et al., 2020). La menor depredación implica menor degradación proteica y una mayor utilización del NNP, lo que resulta en una menor concentración de amoníaco ruminal (Giuliodori et al., 2013).

5.5. Períodos Preparto y Posparto

El efecto de los tratamientos sobre las distintas variables evaluadas fue distinto en el preparto y el posparto. Mientras que en el preparto se encontró efecto de los tratamientos sólo sobre la población de protozoarios, en el posparto se pudo constatar un efecto sobre el N-amoniaco, C4 y protozoarios, y además una tendencia en la concentración de AGVt y C3 ($p=0.09$ y 0.08 , respectivamente).

Aunque no se realizaron comparaciones estadísticas entre el preparto y el posparto, se observa una reducción numérica de la concentración de N-amoniaco y de la población de protozoarios en el posparto con relación al preparto. Entre las causas que podrían explicar estas diferencias se encuentran la calidad de la dieta y nivel de consumo de materia seca (CMS). En cuanto a la calidad de la dieta, en el posparto se suministró una TMR con mayor contenido de PC, menor FDN y menor FDA y una mayor concentración energética con relación a la dieta preparto, además los animales accedían a una sesión de pastoreo entre los ordeños; consecuentemente los productos finales de fermentación variarán. Esto se asocia con el CMS, dado que con una dieta de mayor digestibilidad, los niveles de consumo se podrían considerar mayores. Además, es esperable que el efecto depresivo del parto sobre el CMS disminuya a medida que avanza la lactancia. Este mayor CMS asociado a una mayor concentración energética podría implicar una mayor síntesis proteica y por tanto una mayor utilización del nitrógeno amoniacal.

Durante el posparto, el período de muestreo (+30 y +60 días posparto) tuvo un efecto significativo sobre las variables medidas. Entre ambos períodos se observó una reducción del pH ruminal y del C4 y un aumento de la concentración de N-amoniaco y protozoarios. El efecto de los tratamientos fue diferente según el período de muestreo. La mayor parte de las diferencias entre los tratamientos

observadas en el posparto se explican por el período +60 días posparto. En el periodo +30 días posparto los aditivos generaron efectos significativos únicamente sobre el N-amoniacal (reducción). Estos efectos podrían explicarse por un aumento en el CMS total durante el período +60 y posiblemente a una mayor participación del forraje de la dieta.

6. Conclusiones

Los aditivos alimentarios pueden considerarse como una estrategia viable para modular la fermentación ruminal en vacas lecheras durante el período de transición e inicio de lactancia en sistemas pastoriles mixtos.

Los efectos de la monensina y de los extractos de plantas sobre los parámetros ruminales y sobre la población de protozoarios fueron similares. Ambos aditivos generaron una reducción de la población de protozoarios tanto en el preparto como en el posparto. A su vez, generaron una reducción en la concentración del N-amoniaco junto con una mayor estabilidad que, en el caso de los extractos de plantas, se mantuvo durante todo el período posparto, mientras que el efecto de la monensina se observó en el posparto temprano. El pH ruminal y la producción de AGV totales no fueron afectados por la utilización de los aditivos, aunque se observó una tendencia al aumento de C3.

A través de esta investigación, relevamos que los extractos de planta pueden considerarse una alternativa potencial al uso de monensina. Sin embargo, es importante tener en cuenta que el efecto de estos aditivos depende de varios factores como la composición de la mezcla de extractos, la dosis utilizada, la composición de la dieta, la etapa de lactancia y el sistema de alimentación.

Se requiere más investigación para comprender mejor la capacidad de los aditivos alimentarios para modular la fermentación ruminal. En este trabajo se observó un fuerte efecto sobre los protozoarios ruminales, sin embargo, es necesario ampliar el estudio hacia el resto de la microbiota ruminal. Un conocimiento más profundo del uso de aditivos en vacas lecheras en transición en sistemas mixtos será útil para lograr un aumento de la eficiencia de producción de los sistemas de producción de leche de Uruguay.

7. Bibliografía

- Aguerre, M., Cajarville, C., La Manna, A., Cavestany, D., Mendoza, A., Mattiauda, D. A., Carriquiry, M., Repetto, J. L., Meikle, A., & Chilbroste, P. (2019). *Estrategias de alimentación de vacas lecheras en pastoreo: ¿Qué hemos aprendido de los sistemas comerciales y qué hemos generado desde la investigación en Uruguay?* ANII; UdelaR; CONAPROLE; INIA; CRI; INALE.
<http://www.spluy.com/documentos/difusion/RevistaEstrategiasdealimentacion.pdf>
- Aguerre, M. J., Capozzolo, M. C., Lencioni, P., Cabral, C., & Wattiaux, M. A. (2016). Effect of quebracho-chestnut tannin extracts at 2 dietary crude protein levels on performance, rumen fermentation, and nitrogen partitioning in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 99(6), 4476-4486.
<https://doi.org/10.3168/jds.2015-10745>
- Alexandratos, N., & Bruinsma, J. (2012). *World agriculture towards 2030/2050: The 2012 revision*. FAO. <https://doi.org/10.22004/AG.ECON.288998>
- Ammum, M. (2019, 4 de febrero). *Transition cow management*. SlideShare.
<https://www.slideshare.net/ammanch1/transition-cow-management-130480966>
- Aschenbach, J. R., Kristensen, N. B., Donkin, S. S., Hammon, H. M., & Penner, G. B. (2010). Gluconeogenesis in dairy cows: The secret of making sweet milk from sour dough. *IUBMB Life*, 62(12), 869-877.
<https://doi.org/10.1002/iub.400>
- Bach, A., Calsamiglia, S., & Stern, M. D. (2005). Nitrogen Metabolism in the Rumen. *Journal of Dairy Science*, 88, e9-e21.
[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)73133-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)73133-7)
- Baeck, J. M. (2012). *Transición de la vaca lechera: Nuevos criterios nutricionales que desafían nuestros paradigmas*. Sitio Argentino de Producción Animal. https://www.produccion-animal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/metabolicas/metabolicas_bovinos/53-transicion.pdf
- Bargo, F., Muller, L. D., Kolver, E. S., & Delahoy, J. E. (2003). Invited Review: Production and Digestion of Supplemented Dairy Cows on Pasture. *Journal of Dairy Science*, 86(1), 1-42. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73581-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73581-4)
- Bargo, F., Muller, L. D., Varga, G. A., Delahoy, J. E., & Cassidy, T. W. (2002). Ruminant Digestion and Fermentation of High-Producing Dairy Cows with Three Different Feeding Systems Combining Pasture and Total Mixed Rations. *Journal of Dairy Science*, 85(11), 2964-2973.
[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(02\)74382-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(02)74382-8)
- Behera, S. S., Ray, R. C., Das, U., Panda, S. K., & Saranraj, P. (2019). Microorganisms in Fermentation. En A. Berenjian (Ed.), *Essentials in Fermentation Technology* (pp. 1-39). Springer.
https://doi.org/10.1007/978-3-030-16230-6_1

- Belanche, A., de la Fuente, G., & Newbold, C. J. (2014). Study of methanogen communities associated with different rumen protozoal populations. *FEMS Microbiology Ecology*, 90(3), 663-677. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12423>
- Benchaar, C. (2020). Feeding oregano oil and its main component carvacrol does not affect ruminal fermentation, nutrient utilization, methane emissions, milk production, or milk fatty acid composition of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 103(2), 1516-1527. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17230>
- Benchaar, C., Calsamiglia, S., Chaves, A. V., Fraser, G. R., Colombatto, D., McAllister, T. A., & Beauchemin, K. A. (2008). A review of plant-derived essential oils in ruminant nutrition and production. *Animal Feed Science and Technology*, 145(1-4), 209-228. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2007.04.014>
- Benchaar, C., Hristov, A. N., & Greathead, H. (2009). Essential oils as feed additives in ruminant nutrition. En T. Steiner (Ed.), *Phytogenics in Animal Nutrition: Natural Concepts to Optimize Gut Health and Performance* (pp. 111-146). Nottingham University Press.
- Benchaar, C., Petit, H. V., Berthiaume, R., Ouellet, D. R., Chiquette, J., & Chouinard, P. Y. (2007). Effects of essential oils on digestion, ruminal fermentation, rumen microbial populations, milk production, and milk composition in dairy cows fed alfalfa silage or corn silage. *Journal of Dairy Science*, 90(2), 886-897. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(07\)71572-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(07)71572-2)
- Benchaar, C., Petit, H. V., Berthiaume, R., Whyte, T. D., & Chouinard, P. Y. (2006). Effects of addition of essential oils and monensin premix on digestion, ruminal fermentation, milk production, and milk composition in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 89(11), 4352-4364. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72482-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72482-1)
- Bernhoft, A. (2010). A brief review on bioactive compounds in plants. En A. Bernhoft (Ed.), *Bioactive compounds in plants: Benefits and risks for man and animals* (pp. 11-17). Novus forlag.
- Blanch, M., Carro, M. D., Ranilla, M. J., Viso, A., Vázquez-Añón, M., & Bach, A. (2016). Influence of a mixture of cinnamaldehyde and garlic oil on rumen fermentation, feeding behavior and performance of lactating dairy cows. *Animal Feed Science and Technology*, 219, 313-323. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2016.07.002>
- Bodas, R., Prieto, N., García-González, R., Andrés, S., Giráldez, F. J., & López, S. (2012). Manipulation of rumen fermentation and methane production with plant secondary metabolites. *Animal Feed Science and Technology*, 176(1-4), 78-93. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2012.07.010>
- Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S., & Gontier, E. (2001). Production of plant secondary metabolites: A historical perspective. *Plant Science*, 161(5), 839-851. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(01\)00490-3](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(01)00490-3)

- Bretschneider, G. (2009). Beneficios del uso de monensina en la alimentación del ganado para carne, leche y cría. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, 10(10). <https://www.redalyc.org/pdf/636/63617128021.pdf>
- Burt, S. (2004). Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods: A review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), 223-253. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022>
- Busquet, M., Calsamiglia, S., Ferret, A., Carro, M. D., & Kamel, C. (2005). Effect of garlic oil and four of its compounds on rumen microbial fermentation. *Journal of Dairy Science*, 88(12), 4393-4404. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)73126-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)73126-X)
- Busquet, M., Calsamiglia, S., Ferret, A., & Kamel, C. (2006). Plant Extracts Affect In Vitro Rumen Microbial Fermentation. *Journal of Dairy Science*, 89(2), 761-771. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72137-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72137-3)
- Cáceres, E. (2019). *Piruvato Carboxilasa como encrucijada en el metabolismo* [Trabajo final de grado, Universidad de La Laguna]. RIULL. <http://riull.ull.es/xmlui/handle/915/12345>
- Cajarville, C., Mendoza, A., Santana, A., & Repetto, J. L. (2012). En tiempos de intensificación productiva... ¿Cuánto avanzamos en el conocimiento de los nuevos sistemas de alimentación de la vaca lechera? *Veterinaria (Montevideo)*, 48(Suppl. 1), 35-39. <http://www.ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/11770/1/AUPA-2012-35-39-Cajarville.pdf>
- Calsamiglia, S., Busquet, M., Cardozo, P. W., Castillejos, L., & Ferret, A. (2007). Essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. *Journal of Dairy Science*, 90(6), 2580-2595. <https://doi.org/10.3168/jds.2006-644>
- Canaes, T. S., Zanferari, F., Maganhe, B. L., Takiya, C. S., Silva, T. H., Del Valle, T. A., & Rennó, F. P. (2017). Increasing dietary levels of citral oil on nutrient total tract digestibility, ruminal fermentation, and milk composition in Saanen goats. *Animal Feed Science and Technology*, 229, 47-56. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2017.05.002>
- Cancho, B., García, M. S., & Simal, J. (2000). El uso de los antibióticos en la alimentación animal: Perspectiva actual. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 3(1), 39-47. <https://doi.org/10.1080/11358120009487647>
- Cardoso, F. C., Kalscheur, K. F., & Drackley, J. K. (2020). Symposium review: Nutrition strategies for improved health, production, and fertility during the transition period. *Journal of Dairy Science*, 103(6), 5684-5693. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17271>
- Cardozo, P. W., Calsamiglia, S., Ferret, A., & Kamel, C. (2006). Effects of alfalfa extract, anise, capsicum, and a mixture of cinnamaldehyde and eugenol on ruminal fermentation and protein degradation in beef heifers fed a high-concentrate diet. *Journal of Animal Science*, 84(10), 2801-2808. <https://doi.org/10.2527/jas.2005-593>

- Castillejos, L., & Bellaterra, V. (2005). *Modificación de la fermentación microbiana ruminal mediante compuestos de aceites esenciales* [Disertación doctoral, Universidad Autónoma de Barcelona]. TDX . <http://hdl.handle.net/10803/5663>
- Castillejos, L., Calsamiglia, S., & Ferret, A. (2006). Effect of essential oil active compounds on rumen microbial fermentation and nutrient flow in in vitro systems. *Journal of Dairy Science*, 89(7), 2649-2658. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72341-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72341-4)
- Castillejos, L., Calsamiglia, S., Ferret, A., & Losa, R. (2007). Effects of dose and adaptation time of a specific blend of essential oil compounds on rumen fermentation. *Animal Feed Science and Technology*, 132(3-4), 186-201. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2006.03.023>
- Cedrola, F., Rossi, M., Dias, R. J. P., Martinele, I., & D'Agosto, M. (2015). Methods for Taxonomic Studies of Rumen Ciliates (Alveolata: Ciliophora): A Brief Review. *Zoological Science*, 32(1), 8-15. <https://doi.org/10.2108/zs140125>
- Centro de Estudios de la Realidad Económica y Social. (2021). *El sector lácteo como motor del desarrollo económico y social del Uruguay*. https://ceres.uy/admin/uploads/slides/archivo_1669002285.pdf
- Chaney, A. L., & Marbach, E. P. (1962). Modified Reagents for Determination of Urea and Ammonia. *Clinical Chemistry*, 8(2), 130-132. <https://doi.org/10.1093/clinchem/8.2.130>
- Chaves, A. V., Dugan, M. E. R., Stanford, K., Gibson, L. L., Bystrom, J. M., McAllister, T. A., Van Herk, F., & Benchaar, C. (2011). A dose-response of cinnamaldehyde supplementation on intake, ruminal fermentation, blood metabolites, growth performance, and carcass characteristics of growing lambs. *Livestock Science*, 141(2-3), 213-220. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2011.06.006>
- Chaves, A. V., Stanford, K., Dugan, M. E. R., Gibson, L. L., McAllister, T. A., Van Herk, F., & Benchaar, C. (2008a). Effects of cinnamaldehyde, garlic and juniper berry essential oils on rumen fermentation, blood metabolites, growth performance, and carcass characteristics of growing lambs. *Livestock Science*, 117(2-3), 215-224. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2007.12.013>
- Chaves, A. V., Stanford, K., Gibson, L. L., McAllister, T. A., & Benchaar, C. (2008b). Effects of carvacrol and cinnamaldehyde on intake, rumen fermentation, growth performance, and carcass characteristics of growing lambs. *Animal Feed Science and Technology*, 145(1-4), 396-408. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2007.04.016>
- Chilibroste, P. (2015). Carga o productividad individual? Pasto o concentrado? Mitos y realidades en la intensificación de los sistemas de producción de leche en Uruguay. En E. Giannechini & D. Matto (Eds.), *XLIII Jornadas Uruguayas de Buiatría* (pp. 158-162). Centro Médico Veterinario de Paysandú. http://www.fvet.edu.uy/images/Biblioteca/Jornadas_Buiatria/JB2015c.pdf

- Chilibroste, P., Mattiauda, D. A., Bentancur, O., Soca, P., & Meikle, A. (2012). Effect of herbage allowance on grazing behavior and productive performance of early lactation primiparous Holstein cows. *Animal Feed Science and Technology*, 173(3-4), 201-209. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2012.02.001>
- Cieslak, A., Zmora, P., Pers-Kamczyc, E., & Szumacher-Strabel, M. (2012). Effects of tannins source (*Vaccinium vitis idaea* L.) on rumen microbial fermentation in vivo. *Animal Feed Science and Technology*, 176(1-4), 102-106. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2012.07.012>
- Cobellis, G., Trabalza-Marinucci, M., & Yu, Z. (2016). Critical evaluation of essential oils as rumen modifiers in ruminant nutrition: A review. *Science of the Total Environment*, 545-546, 556-568. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.12.103>
- Contreras, P. A., & Noro, M. (2010). *Rumen: Morfofisiología, trastornos y modulación de la actividad fermentativa* (3ra. ed.). Consorcio Lechero.
- D'Agosto, M., & Carneiro, M. E. (1999). Evaluation of lugol solution used for counting rumen ciliates. *Revista Brasileira de Zoologia*, 16(3), 725-729. <https://doi.org/10.1590/S0101-81751999000300011>
- Da Silva, R. B., Pereira, M. N., De Araujo, R. C., De Rezende Silva, W., & Pereira, R. A. N. (2020). A blend of essential oils improved feed efficiency and affected ruminal and systemic variables of dairy cows. *Translational Animal Science*, 4(1), 182-193. <https://doi.org/10.1093/TAS/TXZ183>
- Decreto N.º 98/011. (2011, 2 de marzo). Diario Oficial, (28.185), 6. <https://www.impo.com.uy/diariooficial/2011/03/16/6>
- De Moura, D. C., Torres, R. N. S., Da Silva, H. M., Donadia, A. B., Menegazzo, L., Xavier, M. L. M., Alessi, K. C., Soares, S. R., Ghedini, C. P., & De Oliveira, A. S. (2021). Meta-analysis of the effects of ionophores supplementation on dairy cows performance and ruminal fermentation. *Livestock Science*, 254, Artículo e104729. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2021.104729>
- Dehority, B. A. (1984). Evaluation of subsampling and fixation procedures used for counting rumen protozoa. *Applied and Environmental Microbiology*, 48(1), 182-185. <https://doi.org/10.1128/aem.48.1.182-185.1984>
- Delaby, L., Finn, J. A., Grange, G., & Horan, B. (2020). Pasture-Based Dairy Systems in Temperate Lowlands: Challenges and Opportunities for the Future. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 4, Artículo e543587. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2020.543587>
- Dennis, S. M., Nagaraja, T. G., & Bartley, E. E. (1981). Effects of Lasalocid or Monensin on lactate-producing or using rumen bacteria. *Journal of Animal Science*, 52(2), 418-426. <https://doi.org/10.2527/jas1981.522418x>
- Dinius, D. A., Simpson, M. E., & Marsh, P. B. (1976). Effect of Monensin Fed with Forage on Digestion and the Ruminant Ecosystem of Steers. *Journal of Animal Science*, 42(1), 229-234. <https://doi.org/10.2527/jas1976.421229x>

- Dirksen, G. U., Liebich, H. G., & Mayer, E. (1985). Adaptive Changes of the Ruminal Mucosa and Their Functional and Clinical Significance. *The Bovine Practitioner*, 20, 116-120. <https://doi.org/10.21423/bovine-vol1985no20p116-120>
- Do Prado, R. M., Côrtes, C., Benchaar, C., & Petit, H. V. (2015). Interaction of sunflower oil with monensin on milk composition, milk fatty acid profile, digestion, and ruminal fermentation in dairy cows. *Animal Feed Science and Technology*, 207, 85-92. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2015.06.017>
- Drackley, J. K. (1999). ADSA foundation scholar award: Biology of dairy cows during the transition period: The final frontier? *Journal of Dairy Science*, 82(11), 2259-2273. [https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(99\)75474-3](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(99)75474-3)
- Drong, C., Meyer, U., Von Soosten, D., Frahm, J., Rehage, J., Breves, G., & Dänicke, S. (2016). Effect of monensin and essential oils on performance and energy metabolism of transition dairy cows. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 100(3), 537-551. <https://doi.org/10.1111/jpn.12401>
- Dschaak, C. M., Williams, C. M., Holt, M. S., Eun, J.-S., Young, A. J., & Min, B. R. (2011). Effects of supplementing condensed tannin extract on intake, digestion, ruminal fermentation, and milk production of lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 94(5), 2508-2519. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3818>
- Duffield, T. F., & Bagg, R. N. (2000). Use of ionophores in lactating dairy cattle: A review. *The Canadian Veterinary Journal*, 41(5), 388-394.
- Duffield, T. F., Rabiee, A. R., & Lean, I. J. (2008). A Meta-Analysis of the Impact of Monensin in Lactating Dairy Cattle: Part 2. Production Effects. *Journal of Dairy Science*, 91(4), 1347-1360. <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0608>
- Ecevit, K., Barros, A. A., Silva, J. M., & Reis, R. L. (2022). Preventing Microbial Infections with Natural Phenolic Compounds. *Future Pharmacology*, 2(4), 460-498. <https://doi.org/10.3390/futurepharmacol2040030>
- Elcoso, G., Zweifel, B., & Bach, A. (2019). Effects of a blend of essential oils on milk yield and feed efficiency of lactating dairy cows. *Applied Animal Science*, 35(3), 304-311. <https://doi.org/10.15232/aas.2018-01825>
- Erasmus, L. J., Robinson, P. H., Ahmadi, A., Hinders, R., & Garrett, J. E. (2005). Influence of prepartum and postpartum supplementation of a yeast culture and monensin, or both, on ruminal fermentation and performance of multiparous dairy cows. *Animal Feed Science and Technology*, 122(3-4), 219-239. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2005.03.004>
- Eschenlauer, S. C. P., McKain, N., Walker, N. D., McEwan, N. R., Newbold, C. J., & Wallace, R. J. (2002). Ammonia Production by Ruminant Microorganisms and Enumeration, Isolation, and Characterization of Bacteria Capable of Growth on Peptides and Amino Acids from the Sheep

- Rumen. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(10), 4925-4931.
<https://doi.org/10.1128/AEM.68.10.4925-4931.2002>
- Estell, R. E. (2010). Coping with shrub secondary metabolites by ruminants. *Small Ruminant Research*, 94(1-3), 1-9.
<https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2010.09.012>
- Fahey, G. C., & Berger, L. L. (1988). Los carbohidratos en la fermentación de los rumiantes. En D. C. Church (Ed.), *El rumiante: Fisiología digestiva y nutrición* (pp. 305-337). Acirbia.
- Fariña, S., & Chilbroste, P. (2019). Oportunidades y desafíos para el crecimiento de la producción de leche a pasto en Uruguay. *Revista INIA*, (57), 28-32.
<http://www.ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/12947/1/Revista-INIA-57-Junio-2019-p.28-32.pdf>
- Ferreira de Jesus, E., Del Valle, T. A., Calomeni, G. D., Silva, T. H., Takiya, C. S., Vendramini, T. H. A., Paiva, P. G., Silva, G. G., Netto, A. S., & Rennó, F. P. (2016). Influence of a blend of functional oils or monensin on nutrient intake and digestibility, ruminal fermentation and milk production of dairy cows. *Animal Feed Science and Technology*, 219, 59-67.
<https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2016.06.003>
- Finlay, B. J., Esteban, G., Clarke, K. J., Williams, A. G., Embley, T. M., & Hirt, R. P. (1994). Some rumen ciliates have endosymbiotic methanogens. *FEMS Microbiology Letters*, 117(2), 157-161.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1994.tb06758.x>
- Firkins, J. L., & Mackie, R. I. (2020). Ruminal protein breakdown and ammonia assimilation. En C. S. McSweeney & R. I. Mackie (Eds.), *Improving Rumen Function* (pp. 383-420). Burleigh Dodds Science.
<https://doi.org/10.19103/AS.2020.0067.13>
- Flores, A. J., Garcarena, A. D., Hernández Vieyra, J. M., Beauchemin, K. A., & Colombatto, D. (2013). Effects of specific essential oil compounds on the ruminal environment, milk production and milk composition of lactating dairy cows at pasture. *Animal Feed Science and Technology*, 186(1-2), 20-26. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2013.09.001>
- Fraga-Corral, M., Otero, P., Echave, J., Garcia-Oliveira, P., Carpena, M., Jarboui, A., Nuñez-Estevez, B., Simal-Gandara, J., & Prieto, M. A. (2021). By-Products of Agri-Food Industry as Tannin-Rich Sources: A Review of Tannins' Biological Activities and Their Potential for Valorization. *Foods*, 10(1), 137. <https://doi.org/10.3390/foods10010137>
- Frutos, P., Hervás, G., Giráldez, F. J., & Mantecón, A. R. (2004). Review: Tannins and ruminant nutrition. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 2(2), 191. <https://doi.org/10.5424/sjar/2004022-73>
- García, A. (1997). Dosificación de la urea en leche para predecir el balance nutricional en vacas lecheras. En J. Gill, J. Moraes, & M. Rodríguez (Eds.), *XXV Jornadas Uruguayas de Buiatria: IX Congreso Lationamericano* (pp. 1-6). Centro Médico Veterinario de Paysandú.

https://bibliotecadigital.fvet.edu.uy/bitstream/handle/123456789/657/JB1997_D1-6.pdf?sequence=1&isAllowed=y h

- Gershenzon, J., & Croteau, R. (1991). Terpenoids. En G. A. Rosenthal & M. R. Berenbaum (Eds.), *Herbivores: Their interactions with secondary plant metabolites* (Vol. 1, pp. 165-219). Academic Press.
- Ghizzi, L. G., Del Valle, T. A., Takiya, C. S., da Silva, G. G., Zilio, E. M. C., Grigoletto, N. T. S., Martello, L. S., & Rennó, F. P. (2018). Effects of functional oils on ruminal fermentation, rectal temperature, and performance of dairy cows under high temperature humidity index environment. *Animal Feed Science and Technology*, 246, 158-166. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2018.10.009>
- Giannenas, I., Skoufos, J., Giannakopoulos, C., Wiemann, M., Gortzi, O., Lalas, S., & Kyriazakis, I. (2011). Effects of essential oils on milk production, milk composition, and rumen microbiota in Chios dairy ewes. *Journal of Dairy Science*, 94(11), 5569-5577. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-4096>
- Giuliodori, M., Mattioli, G., Picco, S., & Relling, A. (2013). *Fisiología digestiva y metabólica de los rumiantes*. CCB Academic Press. <http://hdl.handle.net/11336/151276>
- Goff, J. P. (2015). Ruminant Digestive Physiology and Intestinal Microbiology. En W. O. Reece (Ed.), *Dukes' Physiology of Domestic Animals* (pp. 522-531). Wiley.
- Goff, J. P., & Horst, R. L. (1997). Physiological Changes at Parturition and Their Relationship to Metabolic Disorders. *Journal of Dairy Science*, 80(7), 1260-1268. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(97\)76055-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(97)76055-7)
- Granzin, B. C., & Dryden, G. M. L. (1999). The effects of monensin on milk production and levels of metabolites in blood and rumen fluid of Holstein-Friesian cows in early lactation. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 39(8), 933-940. <https://doi.org/10.1071/EA99033>
- Green, B. L., McBride, B. W., Sandals, D., Leslie, K. E., Bagg, R., & Dick, P. (1999). The impact of a monensin controlled-release capsule on subclinical ketosis in the transition dairy cow. *Journal of Dairy Science*, 82(2), 333-342. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(99\)75240-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(99)75240-9)
- Grummer, R. R. (1995). Impact of changes in organic nutrient metabolism on feeding the transition dairy cow. *Journal of Animal Science*, 73(9), 2820. <https://doi.org/10.2527/1995.7392820x>
- Harris, L., & Utah, L. (1980). Feedstuffs. En K. Chow (Ed.), *Fish feed technology*. FAO. <https://www.fao.org/3/x5738e/x5738e09.htm#chapter%208.%20feedstuffs>
- Hartmann, T. (2007). From waste products to ecochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry*, 68(22-24), 2831-2846. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.09.017>
- Hassan, F., Arshad, M. A., Ebeid, H. M., Rehman, M. S., Khan, M. S., Shahid, S., & Yang, C. (2020). Phytogetic Additives Can Modulate Rumen

- Microbiome to Mediate Fermentation Kinetics and Methanogenesis Through Exploiting Diet–Microbe Interaction. *Frontiers in Veterinary Science*, 7, Artículo e575801. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.575801>
- Helander, I. M., Alakomi, H.-L., Latva-Kala, K., Mattila-Sandholm, T., Pol, I., Smid, E. J., Gorris, L. G. M., & Von Wright, A. (1998). Characterization of the Action of Selected Essential Oil Components on Gram-Negative Bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(9), 3590-3595. <https://doi.org/10.1021/jf980154m>
- Hristov, A. N., & Jouany, J.P. (2005). Factors affecting the efficiency of nitrogen utilization in the rumen. En A. N. Hristov & E. Pfeffer (Eds.), *Nitrogen and Phosphorus Nutrition of Cattle and Environment* (pp. 117-166). CAB International.
- Hristov, A. N., Ropp, J. K., Zaman, S., & Melgar, A. (2008). Effects of essential oils on in vitro ruminal fermentation and ammonia release. *Animal Feed Science and Technology*, 144(1-2), 55-64. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2007.09.034>
- Huws, S. A., Creevey, C. J., Oyama, L. B., Mizrahi, I., Denman, S. E., Popova, M., Muñoz-Tamayo, R., Forano, E., Waters, S. M., Hess, M., Tapio, I., Smidt, H., Krizsan, S. J., Yáñez-Ruiz, D. R., Belanche, A., Guan, L., Gruninger, R. J., McAllister, T. A., Newbold, C. J., ... Morgavi, D. P. (2018). Addressing Global Ruminant Agricultural Challenges Through Understanding the Rumen Microbiome: Past, Present, and Future. *Frontiers in Microbiology*, 9, Artículo e2161. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02161>
- Huws, S. A., Williams, C. L., & McEwan, N. R. (2020). Ruminal-ciliated protozoa. En C. S. McSweeney (Ed.), *Improving rumen function* (pp. 191-220). Burleigh Dodds Science. <https://doi.org/10.19103/AS.2020.0067.08>
- Instituto Nacional de la Leche. (2021). *Situación y perspectivas de la lechería uruguaya: Período: enero—diciembre 2021*. <https://www.inale.org/wp-content/uploads/2022/05/Situacionyperspectivasversionfinal.pdf>
- Johnson, D. E., Hill, T. M., Ward, G. M., Johnson, K. A., Branine, M. E., Carmean, B. R., & Lodman, D. W. (1993). Ruminants and Other Animals. En M. A. K. Khalil (Ed.), *Atmospheric Methane: Sources, Sinks, and Role in Global Change* (pp. 199-229). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-642-84605-2_11
- Jouany, J.P. (1996). Effect of Rumen Protozoa on Nitrogen Utilization by Ruminants. *The Journal of Nutrition*, 126(4), 1335S-1346S. https://doi.org/10.1093/jn/126.suppl_4.1335S
- Jouany, J. P., Demeyer, D. I., & Grain, J. (1988). Effect of defaunating the rumen. *Animal Feed Science and Technology*, 21(2-4), 229-265. [https://doi.org/10.1016/0377-8401\(88\)90105-8](https://doi.org/10.1016/0377-8401(88)90105-8)
- Jouany, J. P., & Morgavi, D. P. (2007). Use of «natural» products as alternatives to antibiotic feed additives in ruminant production. *Animal*, 1(10), 1443-1466. <https://doi.org/10.1017/S1751731107000742>

- Kholif, A. E., Hassan, A. A., El Ashry, G. M., Bakr, M. H., El-Zaiat, H. M., Olafadehan, O. A., Matloup, O. H., & Sallam, S. M. A. (2021). Phytogetic feed additives mixture enhances the lactational performance, feed utilization and ruminal fermentation of Friesian cows. *Animal Biotechnology*, 32(6), 708-718. <https://doi.org/10.1080/10495398.2020.1746322>
- Kholif, A. E., Kassab, A. Y., Azzaz, H. H., Matloup, O. H., Hamdon, H. A., Olafadehan, O. A., & Morsy, T. A. (2018). Essential oils blend with a newly developed enzyme cocktail works synergistically to enhance feed utilization and milk production of Farafra ewes in the subtropics. *Small Ruminant Research*, 161, 43-50. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2018.02.011>
- Kholif, A. E., Matloup, O. H., Morsy, T. A., Abdo, M. M., Abu Elella, A. A., Anele, U. Y., & Swanson, K. C. (2017). Rosemary and lemongrass herbs as phytogetic feed additives to improve efficient feed utilization, manipulate rumen fermentation and elevate milk production of Damascus goats. *Livestock Science*, 204, 39-46. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2017.08.001>
- Kholif, A. E., & Olafadehan, O. A. (2021). Essential oils and phytogetic feed additives in ruminant diet: Chemistry, ruminal microbiota and fermentation, feed utilization and productive performance. *Phytochemistry Reviews*, 20(6), 1087-1108. <https://doi.org/10.1007/s11101-021-09739-3>
- Khorrami, B., Vakili, A. R., Mesgaran, M. D., & Klevenhusen, F. (2015). Thyme and cinnamon essential oils: Potential alternatives for monensin as a rumen modifier in beef production systems. *Animal Feed Science and Technology*, 200(1), 8-16. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2014.11.009>
- Klein, B. G. (2014). *Cunningham Fisiología Veterinaria* (5ta. ed.). Elsevier.
- Klop, G., Dijkstra, J., Dieho, K., Hendriks, W. H., & Bannink, A. (2017). Enteric methane production in lactating dairy cows with continuous feeding of essential oils or rotational feeding of essential oils and lauric acid. *Journal of Dairy Science*, 100(5), 3563-3575. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-12033>
- Kolver, E. S., & Muller, L. D. (1998). Performance and Nutrient Intake of High Producing Holstein Cows Consuming Pasture or a Total Mixed Ration. *Journal of Dairy Science*, 81(5), 1403-1411. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(98\)75704-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(98)75704-2)
- Lee, K. W., Everts, H., & Beynen, A. C. (2004). Essential Oils in Broiler Nutrition. *International Journal of Poultry Science*, 3(12), 738-752. <https://doi.org/10.3923/ijps.2004.738.752>
- Leguizamon, J., & Carreño, F. P. (2013). *Defaunación ruminal un mecanismo favorable en la eficiencia nutricional de bovinos* [Trabajo final de grado, Universidad Nacional Abierta y a Distancia]. Repositorio Institucional UNAD. <https://repository.unad.edu.co/handle/10596/1479>

- Lin, B., Lu, Y., Salem, A. Z. M., Wang, J. H., Liang, Q., & Liu, J. X. (2013). Effects of essential oil combinations on sheep ruminal fermentation and digestibility of a diet with fumarate included. *Animal Feed Science and Technology*, 184(1-4), 24-32. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2013.05.011>
- Lourenço, M., Van Ranst, G., Vlaeminck, B., De Smet, S., & Fievez, V. (2008). Influence of different dietary forages on the fatty acid composition of rumen digesta as well as ruminant meat and milk. *Animal Feed Science and Technology*, 145(1-4), 418-437. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2007.05.043>
- Lustre Sánchez, H. (2022). Los superpoderes de las plantas: Los metabolitos secundarios en su adaptación y defensa. *Revista Digital Universitaria*, 23(2). <https://doi.org/10.22201/cuaieed.16076079e.2022.23.2.10>
- Mackie, R. I., McSweeney, C. S., & Aminov, R. I. (2001). Rumen. En Wiley (Ed.), *Encyclopedia of Life Sciences*. <https://doi.org/10.1038/npg.els.0000404>
- Mackie, R. I., & White, B. A. (1990). Recent Advances in Rumen Microbial Ecology and Metabolism: Potential Impact on Nutrient Output. *Journal of Dairy Science*, 73(10), 2971-2995. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(90\)78986-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(90)78986-2)
- Mackinnon, S., Rivoir, C., & Simeto, C. (2020). *Consumo de materia seca en diferentes estrategias de alimentación y control de ambiente productivo durante el primer tercio de la lactancia en vacas Holando* [Trabajo final de grado, Universidad de la República]. Colibrí. <https://hdl.handle.net/20.500.12008/31409>
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Bender, K. S., Buckley, D. H., & Stahl, D. A. (2015). *Brock: Biología de los microorganismos* (14va. ed.). Pearson Educación.
- Mannetje, L. T. (2000). *Measuring biomass of grassland vegetation*. CABI. <https://doi.org/10.1079/9780851993515.0151>
- Mansfield, H. R., Endres, M. I., & Stern, M. D. (1994). Influence of non-fibrous carbohydrate and degradable intake protein on fermentation by ruminal microorganisms in continuous culture. *Journal of Animal Science*, 72(9), 2464-2474. <https://doi.org/10.2527/1994.7292464x>
- Mathew, B., Eastridge, M., Oelker, E. R., Firkins, J. L., & Karnati, S. K. R. (2011). Interactions of monensin with dietary fat and carbohydrate components on ruminal fermentation and production responses by dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 94(1), 396-409. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3580>
- Matloup, O. H., Abd El Tawab, A. M., Hassan, A. A., Hadhoud, F. I., Khattab, M. S. A., Khalel, M. S., Sallam, S. M. A., & Kholif, A. E. (2017). Performance of lactating Friesian cows fed a diet supplemented with coriander oil: Feed intake, nutrient digestibility, ruminal fermentation,

- blood chemistry, and milk production. *Animal Feed Science and Technology*, 226, 88-97. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2017.02.012>
- Mattiauda, D. A., Tamminga, S., Gibb, M. J., Soca, P., Bentancur, O., & Chilbroste, P. (2013). Restricting access time at pasture and time of grazing allocation for Holstein dairy cows: Ingestive behaviour, dry matter intake and milk production. *Livestock Science*, 152(1), 53-62. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2012.12.010>
- McDonald, P., Edwards, R. A., Greenhalgh, J. F. D., Morgan, C. A., Sinclair, L. A., & Wilkinson, R. G. (2022). *Animal Nutrition* (8va. ed.). Pearson Education.
- McGuffey, R. K., Richardson, L. F., & Wilkinson, J. I. D. (2001). Ionophores for Dairy Cattle: Current Status and Future Outlook. *Journal of Dairy Science*, 84, e194-e203. [https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(01\)70218-4](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(01)70218-4)
- McIntosh, F. M., Williams, P., Losa, R., Wallace, R. J., Beever, D. A., & Newbold, C. J. (2003). Effects of essential oils on ruminal microorganisms and their protein metabolism. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(8), 5011-5014. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.8.5011-5014.2003>
- Meikle, A., Cavestany, D., Carriquiry, M., Adrien, M. L., Artegoitia, V., Pereira, I., Rupprechter, G., Pessina, P., Rama, G., Fernández, A., Breijo, M., Laborde, D., Pritsch, O., Juan, M. R., Torres, E., Nicolini, P., Mendoza, A., Dutour, J., Fajardo, M., ... Chilbroste, P. (2013). Summary Advances in Knowledge of the Dairy Cow During the Transition Period in Uruguay: A Multidisciplinary Approach. *Agrociencia (Uruguay)*, 17(1), 141-152. <https://doi.org/10.31285/AGRO.17.528>
- Melchior, E. A., Hales, K. E., Lindholm-Perry, A. K., Freetly, H. C., Wells, J. E., Hemphill, C. N., Wickersham, T. A., Sawyer, J. E., & Myer, P. R. (2018). The effects of feeding monensin on rumen microbial communities and methanogenesis in bred heifers fed in a drylot. *Livestock Science*, 212, 131-136. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2018.03.019>
- Membrive, C. M. B. (2016). Anatomy and Physiology of the Rumen. En D. Millen, M., De Beni Arrigoni, & R. Lauritano Pacheco (Eds.), *Rumenology* (pp. 1-38). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-319-30533-2_1
- Mezzetti, M., Piccioli-Cappelli, F., Bani, P., Amadori, M., Calamari, L., Minuti, A., Looor, J. J., Bionaz, M., & Trevisi, E. (2019). Monensin controlled-release capsule administered in late-pregnancy differentially affects rumination patterns, metabolic status, and cheese-making properties of the milk in primiparous and multiparous cows. *Italian Journal of Animal Science*, 18(1), 1271-1283. <https://doi.org/10.1080/1828051X.2019.1645623>
- Mohammed, N., Ajisaka, N., Lila, Z. A., Hara, K., Mikuni, K., Hara, K., Kanda, S., & Itabashi, H. (2004). Effect of Japanese horseradish oil on methane production and ruminal fermentation in vitro and in steers. *Journal of Animal Science*, 82(6), 1839-1846. <https://doi.org/10.2527/2004.8261839x>

- Naas, A. E., & Pope, P. B. (2020). Ruminal fibre digestion. En C. McSweeney & R. Mackie (Eds.), *Improving Rumen Function* (pp. 349-382). Burleigh Dodds Science. <https://doi.org/10.19103/AS.2020.0067.12>
- Nagaraja, T. G. (2016). Microbiology of the Rumen. En D. D. Millen, M. De Beni Arrigoni, & R. D. Lauritano Pacheco (Eds.), *Rumenology* (pp. 39-61). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-319-30533-2_2
- Nagaraja, T. G., Avery, T. B., Galitzer, S. J., & Harmon, D. L. (1985). Effect of ionophore antibiotics on experimentally induced lactic acidosis in cattle. *American Journal of Veterinary Research*, 46(12), 2444-2452.
- Nagaraja, T. G., Newbold, C. J., Van Nevel, C. J., & Demeyer, D. I. (1997). Manipulation of ruminal fermentation. En P. N. Hobson & C. S. Stewart (Eds.), *The Rumen Microbial Ecosystem* (pp. 523-632). Springer. https://doi.org/10.1007/978-94-009-1453-7_13
- Newbold, C. J. (2017). Feed supplements for dairy cattle. En J. Webster (Ed.), *Achieving sustainable production of milk* (Vol. 3, pp. 295-326). Burleigh Dodds Science. <https://doi.org/10.19103/AS.2016.0006.15>
- Newbold, C. J., De La Fuente, G., Belanche, A., Ramos-Morales, E., & McEwan, N. R. (2015). The Role of Ciliate Protozoa in the Rumen. *Frontiers in Microbiology*, 6, Artículo e1313. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01313>
- Newbold, C. J., Wallace, R. J., & Walker, N. D. (1993). The effect of tetracycline and monensin on fermentation, microbial numbers and the development of ionophore-resistant bacteria in the rumen. *The Journal of applied bacteriology*, 75(2), 129-134. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1993.tb02757.x>
- Ninabanda, J. J. (2018). Impacto del balance energético negativo en vacas lecheras tratadas con somatotropina recombinante bovina. *Revista Veterinaria*, 29(1), 68-72. <https://doi.org/10.30972/vet.2912794>
- Niwiska, B. (2012). Digestion in Ruminants. En C.-F. Chang (Ed.), *Carbohydrates: Comprehensive Studies on Glycobiology and Glycotechnology* (pp. 245-258). InTech. <https://doi.org/10.5772/51574>
- Olijhoek, D. W., Hellwing, A. L. F., Grevsen, K., Haveman, L. S., Chowdhury, M. R., Løvendahl, P., Weisbjerg, M. R., Noel, S. J., Højberg, O., Wiking, L., & Lund, P. (2019). Effect of dried oregano (*Origanum vulgare* L.) plant material in feed on methane production, rumen fermentation, nutrient digestibility, and milk fatty acid composition in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 102(11), 9902-9918. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16329>
- Oliver, W. M. (1975). Effect of Monensin on Gains of Steers Grazed on Coastal Bermudagrass. *Journal of Animal Science*, 41(4), 999-1001. <https://doi.org/10.2527/jas1975.414999x>
- Owens, F. N., & Goetsch, A. L. (1988). Fermentación ruminal. En D. C. Church (Ed.), *El Rumiante: Fisiología digestiva y nutrición* (pp. 159-189). Acirbia.

- Owens, F., & Zinn, R. (1988). Metabolismo de la proteína en los rumiantes. En D. C. Church (Ed.), *El Rumiante: Fisiología digestiva y nutrición* (pp. 255-281). Acribia.
- Öztürk, H., & Gur, G. (2021). Rumen Physiology: Microorganisms, Fermentation and Manipulation. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 68(4), 423-434. <https://doi.org/10.33988/auvfd.960447>
- Perry, A. (2011). Putting Dairy Cows Out to Pasture: An Environmental Plus. *Agricultural Research*, 59(5), 18-19. <https://agresearchmag.ars.usda.gov/AR/archive/2011/May/cows0511.pdf>
- Pinos, J. M., & González, S. (2000). Efectos biológicos y productivos de los ionóforos en rumiantes. *Interciencia*, 25(8), 379-385. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=33905004>
- Plascencia, A., & Zinn, R. A. (2014). *The rumen is not a «black box»* [Contribución]. Proceedings Conference Scientific Seminar Managing Ruminant Nutrition-torn between high performance and welfare, Eltville. https://www.researchgate.net/publication/267097759_The_rumen_is_not_a_black_box
- Prange, R. W., Davis, C. L., & Clark, J. H. (1978). Propionate Production in the Rumen of Holstein Steers Fed Either a Control or Monensin Supplemented Diet. *Journal of Animal Science*, 46(4), 1120-1124. <https://doi.org/10.2527/jas1978.4641120x>
- Rearte, D. H. (1993). *Alimentación y composición de la leche en los sistemas pastoriles*. INTA.
- Rearte, D. H. (1994). Digestión y metabolismo en vacas lecheras sobre pasturas templadas de alta calidad. En M. Dubra & H. Montauban (Eds.), *XXII Jornadas Uruguayas de Buiatría* (pp. 86-96). Centro Médico Veterinario de Paysandú. https://bibliotecadigital.fvet.edu.uy/bitstream/handle/123456789/898/JB1994_86-96.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Reglamento (CE) n° 1831/2003: del Parlamento Europeo y del Consejo de 22 de setiembre de 2003 sobre los aditivos en la alimentación animal. (2003, 18 de octubre). Diario Oficial de la Unión Europea, L267, 29-43. <https://www.boe.es/doue/2003/268/L00029-00043.pdf>
- Reglamento (UE) n° 2019/4: del Parlamento Europeo y del Consejo de 11 de diciembre de 2018 relativo a la fabricación, la comercialización y el uso de piensos medicamentosos, por el que se modifica el Reglamento (CE) n° 183/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo y se deroga la Directiva 90/167/CEE del Consejo. (2019, 1 de julio). Diario Oficial de la Unión Europea, L4, 1-23. <https://www.boe.es/doue/2019/004/L00001-00023.pdf>
- Repetto, J. L., & Cajarville, C. (2009). ¿Es posible lograr la sincronización de nutrientes en sistemas pastoriles intensivos? En E. Giannechini, J. Moraes, R. Rivero, & C. Matto (Eds.), *XXXVII Jornadas Uruguayas de Buiatría* (pp. 60-67). Centro Médico Veterinario de Paysandú.

https://bibliotecadigital.fvet.edu.uy/bitstream/handle/123456789/96/JB2009_60-67.pdf?sequence=1&isAllowed=y

- Reynolds, C. K., Aikman, P. C., Lupoli, B., Humphries, D. J., & Beever, D. E. (2003). Splanchnic Metabolism of Dairy Cows During the Transition From Late Gestation Through Early Lactation. *Journal of Dairy Science*, 86(4), 1201-1217. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73704-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73704-7)
- Rezaei Ahvanooei, M. R., Norouzian, M. A., Piray, A. H., Vahmani, P., & Ghaffari, M. H. (2023). Effects of monensin supplementation on lactation performance of dairy cows: A systematic review and dose–response meta-analysis. *Scientific Reports*, 13(1), 568. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-27395-9>
- Roche, J. R., Friggens, N. C., Kay, J. K., Fisher, M. W., Stafford, K. J., & Berry, D. P. (2009). Invited review: Body condition score and its association with dairy cow productivity, health, and welfare. *Journal of Dairy Science*, 92(12), 5769-5801. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2431>
- Rushen, J., Passillé, A. M., Keyserlingk, M. A. G., & Weary, D. M. (2008). Housing for Adult Cattle. En J. Rushen (Ed.), *The Welfare of Cattle* (pp. 142-180). Springer.
- Russell, J. B. (2002). *Rumen Microbiology and Its Role in Ruminant Nutrition*. Cornell University.
- Russell, J. B., & Houlihan, A. J. (2003). Ionophore resistance of ruminal bacteria and its potential impact on human health. *FEMS Microbiology Reviews*, 27(1), 65-74. [https://doi.org/10.1016/S0168-6445\(03\)00019-6](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(03)00019-6)
- Saha, S. K., & Pathak, N. N. (2021). Fundamentals of Animal Nutrition. En *Fundamentals of Animal Nutrition*. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-981-15-9125-9>
- Santos, M. C. B., Araújo, A. P. C., Venturelli, B. C., Freitas, J. E., Barletta, R. V., Gandra, J. R., Paiva, P. G. de, Acedo, T. S., & Rennó, F. P. (2019). Effects of increasing monensin doses on performance of mid-lactating Holstein cows. *Journal of Applied Animal Research*, 47(1), 297-302. <https://doi.org/10.1080/09712119.2019.1629298>
- Schären, M., Drong, C., Kiri, K., Riede, S., Gardener, M., Meyer, U., Hummel, J., Urich, T., Breves, G., & Dänicke, S. (2017). Differential effects of monensin and a blend of essential oils on rumen microbiota composition of transition dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 100(4), 2765-2783. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11994>
- Schwab, C. G., & Broderick, G. A. (2017). A 100-Year Review: Protein and amino acid nutrition in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 100(12), 10094-10112. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13320>
- Seigler, D. S. (1998). *Plant Secondary Metabolism*. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-1-4615-4913-0>
- Sepúlveda, P., & Wittwer, F. (2017). *Período de transición: Importancia en la salud y bienestar de vacas lecheras*. Universidad Austral de Chile.

- Sikkema, J., de Bont, J. A., & Poolman, B. (1994). Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *Journal of Biological Chemistry*, 269(11), 8022-8028. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)37154-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)37154-5)
- Silva, G. G., Takiya, C. S., Del Valle, T. A., de Jesus, E. F., Grigoletto, N. T. S., Nakadonari, B., Cortinhas, C. S., Acedo, T. S., & Rennó, F. P. (2018). Nutrient digestibility, ruminal fermentation, and milk yield in dairy cows fed a blend of essential oils and amylase. *Journal of Dairy Science*, 101(11), 9815-9826. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14789>
- Silva, S. N. S., Chabrillat, T., Kerros, S., Guillaume, S., Gandra, J. R., Carvalho, G. G. P., Silva, F. F., Mesquita, L. G., Gordiano, L. A., Camargo, G. M. F., Ribeiro, C. V. D. M., Araújo, M. L. G. M. L., Alba, H. D. R., Silva, R. D. G., & Freitas, J. E. (2021). Effects of plant extract supplementations or monensin on nutrient intake, digestibility, ruminal fermentation and metabolism in dairy cows. *Animal Feed Science and Technology*, 275, Artículo e114886. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2021.114886>
- Smith-Palmer, A., Stewart, J., & Fyfe, L. (1998). Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *Letters in Applied Microbiology*, 26(2), 118-122. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.1998.00303.x>
- Soltan, Y. A., Natel, A. S., Araujo, R. C., Morsy, A. S., & Abdalla, A. L. (2018). Progressive adaptation of sheep to a microencapsulated blend of essential oils: Ruminal fermentation, methane emission, nutrient digestibility, and microbial protein synthesis. *Animal Feed Science and Technology*, 237, 8-18. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2018.01.004>
- Stahringer, R., Balbuena, O., & Kucseva, D. (2012). *Efecto de la utilización de monensina sobre la aptitud reproductiva de vaquillonas*. Sitio Argentino de Producción Animal. https://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/overnada_promotores_crecimiento/50-monensina_sobre_reproductiva_vaquillas.pdf
- Szumacher-Strabel, M., & Cielak, A. (2012). Dietary Possibilities to Mitigate Rumen Methane and Ammonia Production. En G.Liu (Ed.), *Greenhouse Gases—Capturing, Utilization and Reduction*. InTech. <https://doi.org/10.5772/32105>
- Tager, L. R., & Krause, K. M. (2011). Effects of essential oils on rumen fermentation, milk production, and feeding behavior in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 94(5), 2455-2464. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3505>
- Tamminga, S. (1992). Nutrition Management of Dairy Cows as a Contribution to Pollution Control. *Journal of Dairy Science*, 75(1), 345-357. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(92\)77770-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(92)77770-4)
- Tedeschi, L. O., Fox, D. G., & Tylutki, T. P. (2003). Potential Environmental Benefits of Ionophores in Ruminant Diets. *Journal of Environmental Quality*, 32(5), 1591-1602. <https://doi.org/10.2134/jeq2003.1591>

- Tekippe, J. A., Tacoma, R., Hristov, A. N., Lee, C., Oh, J., Heyler, K. S., Cassidy, T. W., Varga, G. A., & Bravo, D. (2013). Effect of essential oils on ruminal fermentation and lactation performance of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 96(12), 7892-7903. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7128>
- Tomkins, N. W., Denman, S. E., Pilajun, R., Wanapat, M., McSweeney, C. S., & Elliott, R. (2015). Manipulating rumen fermentation and methanogenesis using an essential oil and monensin in beef cattle fed a tropical grass hay. *Animal Feed Science and Technology*, 200(1), 25-34. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2014.11.013>
- Torres, R. N. S., Moura, D. C., Ghedini, C. P., Ezequiel, J. M. B., & Almeida, M. T. C. (2020). Meta-analysis of the effects of essential oils on ruminal fermentation and performance of sheep. *Small Ruminant Research*, 189, 106-148. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2020.106148>
- Valares Mesa, C. (2011). *Variación del metabolismo secundario en plantas debida al genotipo y al ambiente* [Disertación doctoral, Universidad de Extremadura]. Dehesa. https://dehesa.unex.es/bitstream/10662/477/1/TDUEX_9788469494332.pdf
- Van Soest, P. J. (1994). *Nutritional Ecology of the Ruminant*. Cornell University Press.
- Viglizzo, E. (1981). *Dinamica de los sistemas pastoriles de producción lechera*. Hemisferio Sur.
- Viña, S., Z. (2013). Compuestos fenólicos. En J. A. Ringuelet & S. Z. Viña (Eds.), *Productos Naturales Vegetales* (pp. 91-150). Universidad Nacional de la Plata. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/27885>
- Webster, J. (2020). *Understanding the Dairy Cow* (3ra. ed.). Wiley.
- Weimer, P. J. (2015). Redundancy, resilience, and host specificity of the ruminal microbiota: Implications for engineering improved ruminal fermentations. *Frontiers in Microbiology*, 6, Artículo e296. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00296>
- Williams, A. G., & Coleman, G. S. (1992). *The Rumen Protozoa*. Springer.
- World Health Organization. (2018). *Evaluation of certain veterinary drug residues in food: Eighty-fifth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/259895>
- Yang, W. Z., Benchaar, C., Ametaj, B. N., & Beauchemin, K. A. (2010). Dose response to eugenol supplementation in growing beef cattle: Ruminal fermentation and intestinal digestion. *Animal Feed Science and Technology*, 158(1-2), 57-64. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2010.03.019>
- Yáñez-Ruiz, D., & Belanche, A. (2020). Plant secondary compounds: Beneficial roles in sustainable ruminant nutrition and productivity. En C. McSweeney

& R. Mackie (Eds.), *Improving rumen function* (pp. 1-48). Burleigh Dodds Science. <https://doi.org/10.19103/AS.2020.0067.25>

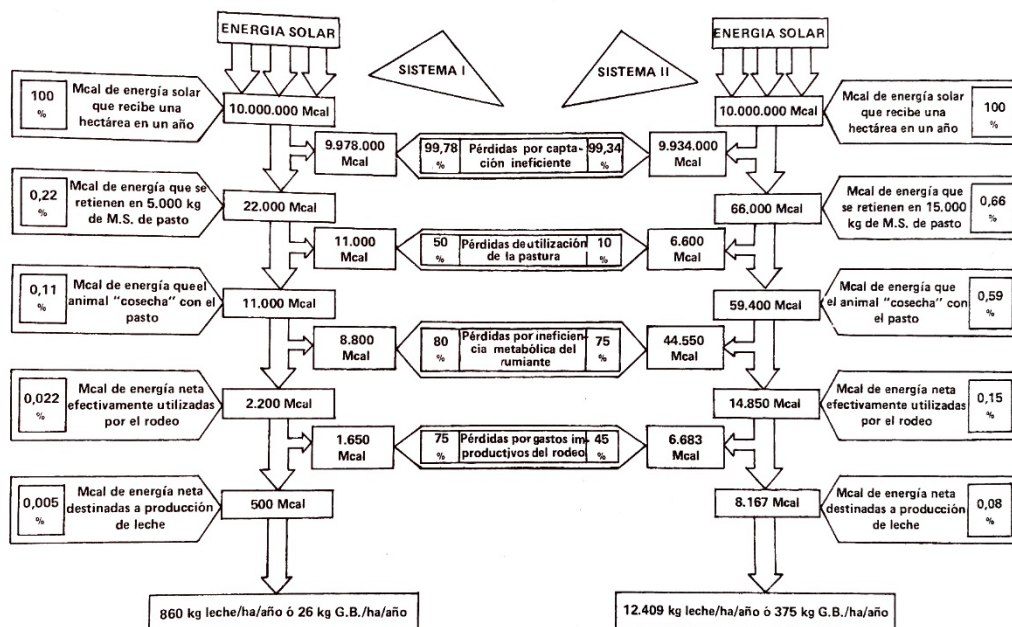
Yokoyama, M. T., & Johnson, K. A. (1988). Microbiología del rumen e intestino. En D. C. Church (Ed.), *El rumiante: Fisiología digestiva y nutrición* (pp. 137-157). Acribia.

Zhao, Y., Wu, Y., & Wang, M. (2015). Bioactive Substances of Plant Origin. En P. C. K. Cheung & B. M. Mehta (Eds.), *Handbook of Food Chemistry* (pp. 967-1008). Springer.

8. Apéndices

Apéndice A.

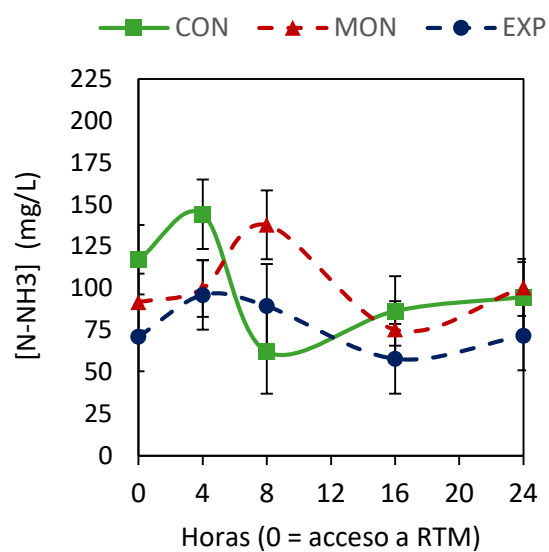
Diagramas de transferencias energéticas en sistemas con distinto nivel tecnológico



Nota. Tomado de Viglizzo (1981).

Bibliografía Apéndice A

Viglizzo, E. (1981). *Dinámica de los sistemas pastoriles de producción lechera*. Hemisferio Sur.

Apéndice B.**Dinámica diaria del N-amoniaco durante el parto**

Nota. DTM: dieta total mezclada. CON: control. MON: monensina. EXP: extracto de plantas. Las barras de error representan el error estándar de la media.