

UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA
SEDE MEDELLÍN

**ACTIVIDAD RUMINAL DE LA ENZIMA GAMMA GLUTAMIL
TRANSFERASA Y NITRÓGENO UREICO EN SANGRE BAJO
TRES NIVELES DE SUPLEMENTACIÓN DE MAGNESIO EN
VACAS HOLSTEIN DURANTE EL ÚLTIMO TERCIO DE
GESTACIÓN**

WILMER ALFONSO CUERVO VIVAS

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
SEDE MEDELLÍN.
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS.
2013.



**ACTIVIDAD RUMINAL DE LA ENZIMA GAMMA GLUTAMIL
TRANSFERASA Y NITRÓGENO UREICO EN SANGRE BAJO
TRES NIVELES DE SUPLEMENTACIÓN DE MAGNESIO EN
VACAS HOLSTEIN DURANTE EL ÚLTIMO TERCIO DE
GESTACIÓN**

Tesis en
CIENCIAS AGRARIAS

Presentada por:
WILMER ALFONSO CUERVO VIVAS

Trabajo de investigación presentado como requisito parcial para obtener el
título de:

MAGISTER EN CIENCIAS AGRARIAS – Producción Animal.

Director:

Ztc. MSc. PhD. HÉCTOR JAIRO CORREA CARDONA.

Línea de Investigación: Metabolismo Nutricional de ganado Lechero.
Grupo de investigación en Interacciones Nutricionales, Metabólicas Y
Reproductivas En Bovinos

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
SEDE MEDELLÍN.
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS.
2013.

Declaratoria de originalidad

Manifiesto que el presente documento es original y se realizó sin violar, transgredir o usurpar los derechos de autor de terceros; por lo tanto es de mi exclusiva autoría y detento la titularidad sobre el mismo. De igual forma, declaro que los datos publicados en este documento son originales y que el trabajo de investigación fue desarrollado en su totalidad por mí, incluyendo el desarrollo de los experimentos en campo, la toma de muestras, los análisis de laboratorio y el análisis de los datos. Los tres primeros experimentos se llevaron a cabo en el Centro de Producción Paysandú de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín y la última fase en la Hacienda privada “San Sebastián” ubicada en el municipio de Aratoca Santander. Los análisis de laboratorio se realizaron en el laboratorio de Análisis Químico y Bromatológico y en el laboratorio de Nutrición Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín y en el laboratorio de Nutrición Animal de la Universidad Cooperativa de Colombia, Sede Bucaramanga.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
Declaratoria de originalidad y reconocimiento	iii
Agradecimientos	iv
Publicaciones	v
Lista de tablas	xii
Lista de figuras	xiv
Lista de imágenes	xv
Lista de graficas	xvi
Glosario	xvii
Resumen	xix
<i>Abstract</i>	xxii
1. CAPÍTULO 1. REVISIÓN DE LITERATURA	25
1.1.1. El Magnesio y su papel en la nutrición animal.	25
1.1.2. Fuentes naturales de Mg en Bovinos.	26
1.1.3. Fuentes Inorgánicas de Mg en Bovinos.	27
1.1.3.1. Ventajas y desventajas de las Fuentes inorgánicas	28
1.1.4. Contenido de Mg en pasto kikuyo	30
1.1.5. Absorción y Biodisponibilidad ruminal de Mg.	31
1.1.6. Consideraciones de la técnica In situ	34
1.2. Liberación ruminal de fuentes inorgánicas Mg y su relación con la enzima Gamma glutamil transferasa.	36
1.2.1. Técnicas de Medición de la liberación ruminal	36
1.2.2. Química, absorción y transporte de Mg en microorganismos	38
1.2.3. Generalidades de la Gamma glutamil transferasa (GGT)	39
1.2.4. Condiciones Ruminales Vs condiciones In vitro.	40
1.3. Concentración ruminal de Mg y actividad de Gamma glutamil transferasa en rumen	41
1.3.1. Estudios de Infusión ruminal	41
1.3.2. Ubicación y Funciones de la GGT	42
1.3.3. Magnesio como cofactor de la GGT	43

1.3.4.	Concentración ruminal de Mg	45
1.4.	Adición de Mg en la dieta de rumiantes y su efecto sobre el metabolismo nitrogenado.	46
1.4.1.	Suplementación de Mg en rumiantes	46
1.4.2.	Niveles tóxicos de Mg dietario.	49
1.4.3.	Relación entre la GGT y el metabolismo nitrogenado ruminal	50
1.4.4.	Nitrógeno ureico en Leche y sangre	53
1.4.5.	Metabolismo Nitrogenado en el rumien durante el parto.	54
1.5	Bibliografía citada	57
2	CAPITULO 2 - ESTIMACIÓN DE LA LIBERACIÓN RUMINAL DE CUATRO FUENTES INORGÁNICAS DE Mg POR MEDIO DE LA TÉCNICA <i>In situ</i>	81
2.1	Resumen	81
2.2	Introducción	83
2.3	Materiales y Métodos	85
2.3.1.	Localización	85
2.3.2.	Animales experimentales.	86
2.3.3	Preparación de las muestras	86
2.3.4.	Incubación de las bolsas.	87
2.3.5.	Determinación de la desaparición de la materia seca (DMS)	87
2.1	Ecuación - Determinación de la desaparición de la materia seca	88
2.3.6.	Análisis estadísticos.	88
2.4.	Resultados y Discusión.	89
2.4.1.	Efecto del tamaño del poro.	92
2.4.2.	Efecto del tiempo y la fuente sobre la DMS (%)	93
2.5.	Conclusiones	98
	Agradecimientos	99
	Abstract	100
2.6.	Bibliografía citada	101

3	CAPITULO 3 - EVALUACIÓN DE MÉTODOS TÉRMICOS, FÍSICOS Y QUÍMICOS SOBRE LA ACTIVIDAD <i>In Vitro</i> DE GAMMA GLUTAMIL TRANSFERASA EN LÍQUIDO RUMINAL BOVINO	113
3.1.	Resumen	113
3.2.	Introducción	114
3.3.	Materiales y Métodos	115
3.3.1.	Localización y Animales.	115
3.3.2	Toma muestras	115
3.3.3	Tratamientos	116
3.3.4	Medición Actividad Enzimática	117
3.3.5	Análisis Estadístico	118
3.4	Resultados y Discusión.	119
3.4.1.	Efecto Térmico, físico y químico en LR congelado.	119
3.4.2	Efecto Térmico y químico sobre LR sin centrifugar.	121
3.5.	Conclusiones	126
3.6.	Recomendaciones	128
	Abstract	129
3.7.	Bibliografía citada	130
4	Capítulo 4- EFECTO DE LA INFUSIÓN INTRARUMINAL DE SALES DE Mg EN LA ACTIVIDAD <i>In Rumen</i> DE LA GGT EN GANADO LECHERO.	144
4.1.	Resumen.	144
4.2.	Introducción.	145
4.3.	Materiales y Métodos.	146
4.3.1	Localización	146
4.3.2	Animales experimentales	147
4.3.3.	Procedimiento experimental.	147
4.3.3.1	Estimación del volumen y concentración Ruminal de Mg.	148
4.3.3.2	Determinación de Actividad Enzimática GGT	148

4.3.4.	Análisis estadístico	149
4.4.	Resultados y discusión	150
4.4.1	Efectos sobre el animal	150
4.4.2	Actividad enzimática promedio.	151
4.4.3	Infusión Mg Vs Aporte dietario y suplementario	152
4.4.4	Contraste de la actividad In vitro e In Rumen en Bovinos y Ovinos.	153
4.4.4.1	Efecto de la Dieta.	155
4.5	Conclusiones.	157
4.6	Recomendaciones	158
	Agradecimientos	1159
	Abstract	159
4.7	Bibliografía citada	160
5	CAPITULO 5 - EFECTO DEL CLORURO DE MAGNESIO EN LA DIETA DE VACAS LECHERAS SECAS SOBRE LA ACTIVIDAD RUMINAL <i>In vivo</i> DE GAMMA GLUTAMIL TRANSFERASA Y NITRÓGENO UREICO EN SANGRE	174
5.1	Resumen.	174
5.2	Introducción.	177
5.3.	Materiales y Métodos.	180
5.3.1.	Localización	180
5.3.2.	Animales experimentales	180
5.3.3.	Dieta y suplementación	180
5.3.4.	Toma de muestras.	183
5.3.4.1	Consideraciones y observaciones para la obtención de líquido ruminal por sonda oro-ruminal	185
5.3.5.	Análisis de Laboratorio	186
5.3.5.1.	Determinación de Actividad Enzimática GGT en LR.	186
5.3.5.2	Determinación de NUS	187
5.4.	Análisis estadísticos.	188
5.5.	Resultados y discusión.	189
5.5.1	Actividad ruminal de GGT.	189

5.5.3	Nitrógeno ureico en sangre (NUS)	194
5.5.4	Relación entre la actividad ruminal de GGT y de NUS.	197
5.6.	Conclusiones	198
5.7.	Recomendaciones.	199
	Agradecimientos	200
5.8.	bibliografía citada	200
	Anexos	214
2.6.1.	Tamaño de Partícula MgO	214
2.6.2.	Tamaño de partícula MgCO ₃	215
2.6.3.	Tamaño de partícula MgSO ₄	215
2.6.4.	Tamaño de partícula MgCl ₂	216

Agradecimientos.

A Dios por darme a María Fernanda y Alfonso, los mejores Padres y a ellos por darme todo lo que nunca tuvieron, por permitirme estudiar en vez de trabajar, gracias a ellos y a nadie por encima de ellos estoy aquí y pude realizar lo plasmado en este trabajo.

A Dios por permitirme ingresar a la Universidad Nacional de Colombia y realizar toda mi formación académica de pregrado y posgrado en ella, ha sido la mejor oportunidad de mi vida.

A Dios por darme a Julie como motor, inspiración y motivo, mi mayor orgullo.

A Dios por darme su mayor prueba, mi Kharoll, sin su apoyo moral no hubiera terminado todo esto.

A Dios por Poner al Profe Héctor Jairo en mi carrera, mi mayor admiración para él, por ser el mejor modelo académico al enseñarme el rigor científico y explicándome lo mucho en lo poco.

A Dios por el apoyo inconmensurable de ángeles como Leito y Claudita, pero especialmente por mis principales apoyos en Medellín, El profesor Ángel Giraldo, a quien tengo en altísima estima y le agradezco por el apoyo constante desde que lo conocí, así como a Santiago Jaramillo que me apoyo en todo durante toda mi maestría.

A dios por bendecirme con los apoyos financieros de la Beca de la Dirección Nacional De Investigaciones DIME y la Beca Virginia Gutiérrez De Pineda para Jóvenes Investigadores de COLCIENCIAS, gracias a las cuales pude desempeñarme de manera tranquila en mi maestría y obtener recursos para la compra de reactivos para mi investigación.

Al profesor Guillermo Correa por sus profundos conocimientos, el apoyo brindado y la paciencia al responder cada uno de mis cuestionamientos estadísticos.

A cesar por enseñarme que debo hacer las cosas por mí mismo...

PUBLICACIONES.

A partir de este proyecto de investigación se han publicado dos resúmenes y un artículo de investigación completo en revistas científicas indexadas del país (A1 y C) y un resumen en una revista internacional. Se han realizado seis ponencias en eventos nacionales y una en un congreso internacional.

Resúmenes de Ponencias Nacionales:

Cuervo W. Correa H. 2012. Efecto del cloruro de magnesio sobre la actividad de aminotransferasas ruminales en vacas lecheras. Presentado en

- II seminario internacional y III nacional de investigadores en salud y producción animal –SENISPA
- XXIII Congreso Panamericano De Ciencias Veterinarias PANVET

Cuervo W. Correa H. Orrego C. 2011. Determinación de la actividad in situ de gama glutamil transferasa (GGT) bajo el efecto de infusión ruminal de magnesio. XI Encuentro Nacional y VI Internacional de investigadores de las ciencias pecuarias ENICIP. Medellín Octubre 2011. Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias; 24 (3) 471.

Cuervo W. Orrego C. Correa H. 2011. Efecto de la adición de sales de magnesio sobre la actividad ruminal in vitro de γ glutamil transferasa. XI Encuentro Nacional y VI Internacional de investigadores de las ciencias pecuarias ENICIP. Medellín Octubre 2011. Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias; 24 (3) 475

Ponencia Internacional.

Cuervo W. Correa H. 2012. Efecto de la adición de cloruro de magnesio en la dieta preparto de vacas lecheras en la actividad de aminotransferasas ruminales. 35º Congreso Argentino de Producción Animal AAPA. Revista Argentina de Producción Animal Vol. 32 Supl. 1 (2012): 202 pp.

Artículo de Investigación sobre resultados del proyecto de tesis.

Cuervo W. Correa H. 2012. Comportamiento de la actividad enzimática de gamma glutamil transferasa en líquido ruminal bovino sometido a métodos térmicos, físicos y químicos. Revista *Spei Domus* Volumen 8 / Número 17 / Julio - Diciembre Del 2012.

LISTA DE TABLAS

	Página
1.1. Contenido aproximado de Mg en materias primas utilizadas para alimentación de rumiantes en zonas templadas.	27
1.2 Fuentes Inorgánicas de Mg, nivel de pureza y contenido de Mg.	28
1.3. Porcentaje del elemento mineral, biodisponibilidad relativa y coeficiente de absorción en fuentes Inorgánicas de Mg	29
1.4 Contenido mineral en muestras de kikuyo recolectadas en Antioquia	30
1.5 Especificaciones y recomendaciones de la técnica In situ	35
1.6 Volumen ruminal y Concentración de Mg en Vacas lecheras.	45
1.7 Composición Química Pasto Estrella (Cynodon nlemfuencis)	47
1.8 Niveles de Suplementación experimental de Mg y efectos en Rumiantes	49
2.1 Solubilidad en medios Acuicos de las fuentes minerales evaluadas	85
2.2 Tamaño de partícula para las Fuentes minerales evaluadas.	59
2.3. Efecto del tamaño del poro, fuente mineral y tiempo de incubación sobre la desaparición de materia seca DMS de las fuentes minerales evaluadas	91
3.1. pH y Poblaciones ruminales en Ovinos y Bovinos.	125
4.1. Comparación de la actividad GGT entre métodos y especies	154

5.1.	Esquema de suplementación en Periodo de Adaptación.	181
5.2	Composición Nutricional Concentrado comercial SOLLALECHE 18 ®	181
5.3	Composición Química Pasto Estrella (Cynodon nlemfuencis)*	182
5.4.	Valores de la actividad de GGT (μ Ktal/L) en tejidos y fluidos corporales de rumiantes.	190

LISTA DE FIGURAS

	Pagina
1.1. Asimilación de amonio en microorganismos por la vía GDH	50
1.2. Asimilación de amonio en microorganismos por la vía GS-GOGAT	51
1.3. Reacciones del ciclo “gamma glutamil” – Rompimiento y Síntesis de Glutathione.	27
3.1. División Muestras y Sub-muestras de líquido ruminal (LR)	116

LISTA DE IMÁGENES

		Página
5.1.	Establo de Manejo para toma de muestras	181
5.2.	Mezcla concentrado comercial y $MgCl_2$	182
5.3	Materiales y ensamble bomba succión para la obtención de LR	184
5.4	Muestreo Sanguíneo y determinación de NUS	188

LISTA DE GRAFICAS

	Pagina
2.1 Efecto de la fuente mineral y el tiempo de incubación sobre la DMS (%)	90
3.1 Efecto del tratamiento físico (centrifugación) sobre la actividad enzimática de GGT en el LR.	120
3.2. Interacción entre el tratamiento térmico y la adición de Mg en LR	121
4.1. Actividad In rumen de GGT en LR antes y después de la infusión de MgCl ₂	151
4.2. Moles de MgCl ₂ adicionados al medio ruminal	152
4.3. Incrementos de la actividad enzimática de GGT en LR luego de la adición de MgCl ₂ evaluadas por técnica In vitro e In rumen	116
5.1. Interacción entre la suplementación y el día de medición sobre la actividad de la GGT.	192
5.2. Interacción entre la suplementación y el día de medición sobre el nivel de NUS.	194
5.3. Regresión entre BUN y el Día de medición del periodo experimental.	195

GLOSARIO

ANAVA: Análisis de Varianza
bH-MB: Bosque húmedo montano bajo
bH-pM: Bosque húmedo pre-montano
Ca: Calcio
Cen: Cenizas
cm: centímetros
CNE: Carbohidratos no estructurales
CNF: Carbohidratos no fibrosos
CR: Contenido ruminal
d: Día
DEL: Días en lactancia
dL: Decilitro
DMS: Desaparición de la materia seca
EE: Extracto etéreo
EM: Energía metabolizable
ENI: Energía neta de lactancia
FDA: Fibra en detergente ácido
FDN: fibra en detergente neutro
g: gramo
GGT: Gamma glutamil transferasa (ó transpeptidasa)
GDH: Glutamato Deshidrogenasa
GS: Glutamina Sintasa
GOGAT: Glutamato sintasa
h: horas
K: Potasio
kg: Kilogramo
L: Litro
LR: Líquido ruminal
Mcal: Mega calorías
mg: Miligramo
Mg: Magnesio
MgCl₂: Cloruro de magnesio
MgSO₄: Sulfato de Magnesio
MgO: Oxido de Magnesio
MgCO₃: Carbonato de Magnesio
mL: Mililitro
MO: Materia orgánica
MS: Materia seca
msnm: metros sobre el nivel del mar
N: Nitrógeno
N-NH₃: Amoníaco
N-NH₄: Amonio
NNP: Nitrógeno no proteico.
NUL: Nitrógeno ureico en leche
NUS: Nitrógeno ureico en sangre
P: Fosforo
p: Probabilidad
PC: Proteína cruda
PV: Peso vivo

r: Coeficiente de correlación
r²: Coeficiente de determinación
rpm: Revoluciones por minutos
μm: Micrómetros
μKtal: MicróKatales
nKtal: MicróKatales

RESUMEN

Teniendo en cuenta reportes previos de la acción de iones divalentes, el objetivo de esta investigación fue determinar el efecto de la suplementación de Mg en forma de sal pura en la dieta de rumiantes sobre la actividad ruminal de una aminotransferasa de interés nutricional y que está relacionada con el metabolismo de nitrógeno, específicamente en la fijación de nitrógeno no proteico.

Para ello se llevaron a cabo cuatro experimentos, los tres primeros se llevaron a cabo en la granja experimental Paysandú de la Universidad Nacional de Colombia (sede Medellín) y el último experimento en una hacienda privada que contaba con un hato lechero de ganado Holstein. En el primer experimento se evaluó la desaparición de la materia seca (DMS) por medio de la técnica *in situ* de cuatro fuentes inorgánicas de Mg en forma de sal pura, las cuales fueron; MgO, MgCO₃, MgSO₄, MgCl₂ evaluando dos tamaños de poro de la bolsa de nailon (25 y 50µm) y tres tiempos de incubación (0, 12 y 24h), en un diseño en bloques completos al azar con un arreglo factorial 2x3x4 (Tamaño x tiempo x fuente Mg).

En el segundo experimento se determinó el efecto de tratamientos secuenciales de descongelación, centrifugación, y adición de sales de magnesio sobre la actividad de la gamma glutamil transferasa (GGT) en líquido ruminal (LR) de bovinos, comparándolo con líquido ruminal fresco (LRF) extraído de los mismos animales experimentales. Se evaluó el efecto de los tres tratamientos (Térmico, Físico y químico) en un diseño de bloques completos al azar (BCA) con un arreglo factorial 2x2x3 (donde los factores fueron el tratamiento térmico con dos niveles, el físico con 2 niveles y el químico con tres niveles) y donde cada animal constituyó un bloque. De igual forma, se compararon las actividades de LR descongelado a temperatura ambiente (LRDC) y LR descongelado en baño de maría (LRCal) con la del LRF por medio de un BCA con arreglo factorial 3x3, donde los factores analizados fueron el tratamiento térmico de descongelación (a temperatura ambiente

[LRDC], con baño de maría [LRCal] y LRF) y el químico ($MgSO_4$ ó $MgCl_2$ ó sin adición).

El tercer experimento determinó el efecto del Mg sobre la actividad *in rumen* de la enzima GGT y así complementar los resultados de los dos primeros estudios. Para lo cual se colectó LRF de los mismos animales experimentales y se realizaron infusiones intraruminales con 53g de cloruro de magnesio ($MgCl_2$). Al cabo de una hora se colectaron muestras LR (LRD). Sobre LRA y LRD se determinó la actividad de la GGT por medio de un kit colorimétrico. Las diferencias estadísticas entre los dos grupos (antes y después de la infusión) fueron determinadas por medio de una prueba de T.

El último experimento se llevó a cabo en la hacienda San Sebastián, ubicada en el municipio de Aratoca Santander (1803 msnm) y analizó el efecto de la suplementación durante 3 semanas de $MgCl_2$ en tres dosis (0, 150 y 300 g/d) sobre la actividad ruminal *in vivo* de GGT y el nivel de nitrógeno ureico en sangre (NUS). Se asignaron 12 vacas Holstein (635 ± 10 Kg PV y 5 años de edad en último tercio de gestación) aleatoriamente a uno de tres tratamientos experimentales. Las variables (GGT y NUS) fueron evaluadas por medio de un diseño completamente al azar con arreglo de medidas repetidas en el tiempo.

En el primer estudio, se observó una mayor DMS del $MgCl_2$ y el $MgSO_4$ con respecto a las demás fuentes minerales sin encontrar diferencias en la DMS entre los dos tamaños de poro, de igual forma se asociaron los resultados obtenidos a factores como el alto pH ruminal, la baja solubilidad en medio acuoso y las propiedades químicas de las fuentes inorgánicas. El segundo experimento reveló que la centrifugación disminuye significativamente la actividad enzimática de la GGT en LR y al agregar $MgCl_2$ (pero no $MgSO_4$) al LRF se observó una actividad enzimática superior a la del LRDC y LRCaI.

El tercer estudio comprobó el efecto positivo de la adición de $MgCl_2$ por medio de la infusión intraruminal sobre la actividad de la GGT, sin embargo el aumento observado al adicionar el Mg fue inferior al reportado en el segundo estudio con LRF. En el último estudio se observó una interacción significativa

entre la suplementación de Mg en la dieta y el tiempo evaluado sobre la actividad de la GGT en LR y el nivel de NUS, observándose un aumento significativo en la enzima en rumen que coincidió con una disminución notable del nivel de NUS en las vacas que recibieron 150 g/d de MgCl₂. Sin embargo se observó un efecto cuadrático tanto en la actividad de la GGT como en el nivel de NUS al aumentar la dosis suplementada, posiblemente relacionado con una saturación de Mg en la fase líquida del rumen. No se observaron efectos negativos (diarrea o disminución del consumo normal) con ninguno de los niveles de Mg suplementados aparte de la astringencia propia del MgCl₂.

Palabras clave: Aminotransferasas, Ganado lechero, iones divalentes, Nitrógeno no proteico, kikuyo, Rumen, trópico alto.

ABSTRACT

Based on previous reports of divalent ion's effect, the objective of this study was to determine the effect of Mg Supply in the form of pure salts, on the ruminal gamma glutamyl transferase (GGT) activity, an aminotransferase related with the nitrogen metabolism, specifically in the Non-protein nitrogen fixation.

For this purpose, four experiments were carried out, the first three of them, were performed in the experimental farm "Paysandu" of the National University (Medellin) and the last one, was made in the private Ranch "San Sebastián" located in Aratoca Santander.

In the first study, the dry matter disappearance (DMD) was evaluated using the in situ technique, incubating four Mg pure salts (MgO, MgCO₃, MgSO₄, MgCl₂) in nylon bags of two pore sizes (25 y 50µm) for three times (0, 12 and 24h) in a randomized complete block (RCB) design with an factorial (2x3x4) arrangement.

In the second experiment was determined the effect of sequential treatments of thawing (RLT RLH), centrifugation (RLTC, RLHC) and Mg salts addition (MgSO₄, MgCl₂ or non-addition) on the GGT activity in ruminal liquor (RL) compare them with the activity observed in fresh ruminal liquor (RFL) within a RCB with an factorial (2x2x3) arrangement, where the analyzed factors were Thermal (two levels), physical (two levels) and chemical (three levels) and every cow was the block. Similarly, was compared the GGT activities of RLT, RLH and FRL (without centrifugation or freezing) using a RCB with an factorial (3x3) arrangement, where the thermal (Thawing or heated or fresh) and the chemical treatment (MgSO₄ or MgCl₂ or non-addition).

The third experiment determines the Mg effect on the *In rumen* GGT activity, complementing in this form, the previous experiments. For this purpose, RLF was collected from the same experimental animals (RLB) and then 53 g of MgCl₂ was infused in the rumen (via cannula). One hour after this infusion RL

was taken (LRA) and in both samples were determined the GGT activity. Its differences were analyzed used a T Test.

The last experiment was carried out in the “San Sebastian” Ranch located in Aratoaca Santander (1803 masl) and analyzed the effect of supplement $MgCl_2$ for three weeks in three doses (0, 150 y 300 g/d) on the *in vivo* GGT ruminal activity and the blood urea nitrogen (BUN). 12 Holstein cows were randomized assigned to one of the three levels. A completely randomized design with repeated measures on time. was used to analyze these effects.

In the first study, greater DMD was observed in $MgCl_2$ y el $MgSO_4$ compared to other treatments and in DMD was not detected any difference between the two pore sizes evaluated. Additionally, the obtained results with MgO and $MgCO_3$ were associated with some other factors such as high ruminal pH, low solubility in aqueous media and the chemical properties of the inorganics sources used. The second experiment reveals that centrifugation significantly decreases GGT activity in LR and by adding $MgCl_2$ (but not $MgSO_4$) to the FRL it was observed a highest GGT activity than in RLT and RLH. The third study did verify the positive effect of the ruminal infusion of $MgCl_2$ on the GGT activity; however the observed increase with this technique was inferior of that reported in the second experiment with the FRL. In the last experiment a significant interaction was observed between the Mg supplementation in the diet and the evaluated time on the ruminal GGT activity and the BUN level. We observed a significant increase in the enzyme in rumen which coincided with a significant decrease in the level of NUS cows received 150 g / d of $MgCl_2$. However quadratic effect was observed both in GGT activity and the level of BUN by increasing the supplemented dose, possibly related with a saturation of Mg in the liquid phase of the rumen. No adverse effects were observed (diarrhea or decrease of normal intake) with any level of Mg supplemented besides the astringency characteristic of $MgCl_2$.

Key words: Aminotransferases, Holstein, divalent ions, Non-protein nitrogen, kikuyo, rumen, High tropic.

CAPITULO 1

REVISIÓN DE LITERATURA.

1.1. Fuentes de Magnesio, su liberación y desaparición ruminal.

1.1.1. El Magnesio y su papel en la nutrición animal.

El Magnesio (Mg) es un importante catión intracelular actuando como coenzima para reacciones enzimáticas vitales en las principales vías metabólicas (NRC, 2001). El Mg es un mineral abundante en la mayoría de las materias primas utilizadas para la alimentación animal (McDowleLel, 1996). Las deficiencias son poco comunes en la mayoría de los animales domésticos (Underwood y Suttle, 1999). Este catión participa en un sinnúmero de procesos bioquímicos como en la activación de grupos fosfatos siendo fundamental en el metabolismo de carbohidratos (McDonald *et al.*, 1971).

En la alimentación de animales domésticos, se han descrito diversas fuentes de Mg, entre las que se pueden citar Óxido (magnesita calcinada), hidróxidos (Ding *et al* 2001) Sulfatos, (Ammeeman *et al* 1972) cloruros (Schonewille 2013), Propionato, Fosfatos y Carbonatos simples y compuestos (Petersen *et al* 2011). En la alimentación de Ganado lechero se han ndescritos resultados positivos a la suplementacion de oxidos (Emery *et al* 1965), hidróxidos (Harris *et al* 1983) en el tratemiendo de acidosis ruminal e hipomagnesemia (Erdman *et al* 1982). De igual forma se ha descrito como las fuentes de mayor solubilidad a nivel ruminal, los sulfatos (Allen y Fontenot 1984) y los cloruros (Roche *et al* 2005).

El Mg cumple funciones vitales relacionadas con la transmisión nerviosa (Church, 1989; Radostits *et al.*, 2002; Relling y Mattioli, 2003). Además posee una función estructural al ser un elemento ligado a los cristales de hidroxiapatita, componente fundamental del esqueleto en animales domésticos (Akers y Denbow, 2008; Conn y Stumpf, 2000) y juega, así mismo, un papel muy importante en la acción enzimática al ser cofactor para más de 300

enzimas relacionadas con el metabolismo energético (Aikawa, 1981). Este elemento participa de igual forma en la síntesis de ADN y ARN (Rubin et al 2003), hace parte de complejos enzimáticos de transporte de fosfatos a la molécula de ADP (Daryl y Granner 2003) y es uno de los elementos envueltos en procesos de contracción y relajación del músculo esquelético (Bender y Mayes 2003).

La cantidad de Mg necesaria para satisfacer el requerimiento diario varía ampliamente dependiendo del estado fisiológico (NRC, 2001) sin embargo se ha llegado a suplementar entre 0,4% (O`Kelly y Fontenont, 1969) hasta 0,6% de la materia seca total (Erdman *et al.*, 1980) sin observarse efectos negativos en vacas lecheras.

1.1.2. Fuentes naturales de Mg en bovinos.

Los forrajes son, por supuesto, la principal fuente de Mg para los rumiantes y en algunos casos la única. En promedio las gramíneas tropicales presentan un contenido de Mg cercano a 0,36 % mientras que las leguminosas presentan alrededor de 0,28 % (Minson, 1990). De manera general, el contenido de Mg es menor en gramíneas y leguminosas de zonas templadas cuyos contenidos varían entre 0,18 y 0,26 % de la materia seca (Minson, 1990).

Los alimentos concentrados, tanto energéticos como proteicos presentan, en promedio, un mayor contenido de Mg que los forrajes (Adediji and Suttle, 1999). Los granos de cereales, las harinas de pescado y las tortas de oleaginosas presentan un contenido creciente de Mg de hasta 5,8 % (Ver tabla 1.1).

Para las harinas de origen animal, se han descrito contenidos variables, Minson (1990) anota que con el incremento en el contenido de hueso, aumenta el contenido de Mg, no obstante el contenido promedio es de 2 g de Mg / Kg de Materia seca.

Los principales factores que afectan el contenido de minerales en los forrajes incluyen el tipo de suelo, la especie forrajera, estado de madurez de la planta, manejo de la pradera y clima (Reid and Horvath, 1980; Espinoza et al 1991; McDowell 1996). En el caso de los forrajes más utilizados en lecherías colombianas, el contenido de Mg suele ser superior al requerimiento reportado por la literatura (Correa *et al.*, 2008). Es así como los reportes para el pasto kikuyo (*Cenchrus clandestinus* (Hoechst Ex Chiov) Morrone) (Chemisquy *et al.* 2010) se indica que el contenido de Mg oscila entre 0,22 y 0,36% en base seca (Correa *et al.*, 2008). Los reportes para el pasto rye grass (*Lolium multiflorum*) son superiores alcanzando valores entre 1,1 y 1,9% (Underwood y Suttle, 1999). En gramíneas del genero *Cynodon* cultivadas en trópico bajo, los valores de Mg son cercanos a 0,2% (Sanchez *et al.*, 1987).

Tabla 1.1 Contenido aproximado de Mg en materias primas utilizadas para alimentación de rumiantes en zonas templadas.

Alimento	Contenido (%)	Alimento	Contenido (%)
Forrajes		Concentrados	
Forraje tipo Gramínea	1,6	Maíz	1,3
Paja de cebada	0,7	avena	1,0
Paja de avena	0,9	Harina pescado	2,3
Trébol blanco	2,2	Gluten maíz	4,1
Ensilaje Alfalfa	1,8	Torta Girasol	5,8
Ensilaje Maíz	2,2	Torta algodón	5,8

Adaptado de Underwood y Suttle (1999)

1.1.3 Fuentes Inorgánicas de Mg en bovinos.

En las ganaderías del país, el principal suplemento dietario es la sal mineralizada (MADR, 2010). Este tipo de productos comerciales están compuestos por una mezcla de macro- (Ca, P, Mg, K, S, Na, Cl) y microminerales (Cu, Fe, I, Mn, Mo, Zn) que cumplen funciones de estructura, fisiológicas, catalíticas y regulatorias (Underwood y Suttle, 1999).

El contenido de los macrominerales en la dieta afecta el balance entre cationes y aniones que, a su vez, determina la incidencia de hipocalcemia y

hipomagnesemia, alteraciones que aparecen principalmente en el periodo de transición de la vaca lechera (NRC, 2001; Drackley *et al.*, 2005). Con el objetivo de reducir la incidencias de dichas alteraciones se han utilizado mezclas de macrominerales en forma de sales anónicas combinándolas con suplementación de Ca y Mg, previniendo al mismo tiempo el descenso marcado en el consumo de materia seca, reduciendo la magnitud del balance energético negativo en el posparto temprano y el riesgo de hipocalcemia (Underwood y Suttle, 1999).

En la actualidad las fuentes inorgánicas de Mg utilizadas en la elaboración de alimentos balanceados para animales varían en cuanto a su contenido de este mineral y que va desde 5 hasta un 52% (Tabla 1.2).

Tabla 1.2 Fuentes Inorgánicas de Mg, nivel de pureza y contenido de Mg.

NOMBRE COMÚN	Fórmula química	Magnesio %	Otros minerales %
Óxido (magnesita calcinada)	MgO	52	Ca (2.5-3) / Fe (1.1-2) / Al (0.8)
Sulfato de magnesio heptahidratado	MgSO ₄ .7H ₂ O	10	S (13)
Propionato de magnesio dihidratado	C ₆ H ₁₀ MgO ₄ .2H ₂ O	11.5	-
Cloruro de magnesio hexahidrato	MgCl ₂ .6H ₂ O	12	Cl (35)
Fosfato de magnesio hidratado	MgHPO ₄ .nH ₂ O	26	P (14)
Fosfato cálcico-magnésico hidratado	(Ca,Mg)PO ₄ .nH ₂ O	9	P (18) / Ca (15)
Fosfato de Na, Ca y Mg hidratado	(Na,Ca,Mg)PO ₄ .nH ₂ O	5	P (17.5) / Na (13) / Ca (8)
Carbonato dolomítico	-	11	Ca (21)

Adaptado de FEDNA (2012)

1.1.3.1 Ventajas y desventajas de las fuentes inorgánicas

Numerosos estudios han reportado las ventajas y los efectos positivos de la suplementación inorgánica de minerales. Aholay *et al.*, (2004) encontraron

diferencias significativas en el desempeño productivo en bovinos de carne en pastoreo al suplementar de manera individual Cu, Zn y Mn en forma inorgánica.

McDowell (1996) destaca la elevada biodisponibilidad relativa como una ventaja de la utilización de materiales inorgánicos (ver Tabla 1.3.), lo que quiere decir que a lo largo del tracto gastrointestinal los minerales inorgánicos presentan una mayor disponibilidad para ser utilizadas en reacciones de importancia nutricional. Los quelatos ofrecen otra forma de suplementación mineral con la ventaja de que un agente quelante, como el aminoácido, es capaz de ligarse al metal por lo menos en más de un punto, por poseer dos grupos funcionales (amino y carboxilo), no obstante este tipo de productos se utilizan principalmente para microminerales (Parsi *et al.*, 2001).

Tabla 1.3. Porcentaje del elemento mineral, biodisponibilidad relativa y coeficiente de absorción en fuentes Inorgánicas de Mg

Fuente	% Elemento	Biodisponibilidad	Coefficiente de Absorción ^a
Carbonato de Magnesio	21 – 28	Alta	0,7
Cloruro de Magnesio	12	Alta	0,9
Oxido de Magnesio	54 – 60	Alta	0,7
Sulfato de Magnesio	9,8 – 17	Alta	0,3
Sulfato de Mg y K	11	Alta	NR

Tomado de McDowell (1996)

^a Tomado de NRC 2001

NR = valor no reportado

No obstante, se han documentado algunos efectos nocivos al suplementar fuentes inorgánicas de Mg en las diferentes especies domésticas, al utilizar 30 g de MgO por cada kilogramo de materia seca en dietas para gallinas ponedoras se observó diarrea (Lee y Britton 1987). De igual forma Chester-Jones *et al* (1990) al utilizar sulfatos y óxidos de Mg en dosis elevadas 47 g por cada kilogramo de materia seca, observaron daños en el epitelio ruminal, pérdida de apetito en novillos. No obstante el factor que más influye en la ocurrencia de desordenes es la dosis utilizada más allá de la fuente inorgánica.

1.1.4 Contenido de Mg en pasto kikuyo

En los sistemas de pastoreo de las lecherías especializadas el kikuyo es la gramínea más ampliamente utilizada (Correa *et al.*, 2008). No obstante, uno de los principales problemas detectados en dicho forraje en dos de las tres cuencas lecheras del país (Antioquia y Altiplano Cundiboyacense) es el exceso de K y de P (Correa, 2007; Correa *et al.*, 2008). Regímenes de fertilización altos en N y K aumentan la tasa de crecimiento del forraje y al mismo tiempo el contenido de K (Kemp *et al.*, 1961). Se ha demostrado que forrajes con bajos contenidos de Mg presentan niveles de K de hasta 5% en base seca (Martens y Schweigel, 2000). Altos niveles de K dietarios pueden disminuir la absorción ruminal de Mg incrementando su excreción (Kunkel *et al.*, 1953; Kemp *et al.*, 1961; Newton *et al.*, 1972; Greene *et al.*, 1983).

El contenido de K en el pasto kikuyo oscila entre 1,68 y 5,12% de la Materia seca (MS) con un promedio de 3,69% (Correa *et al.*, 2008) el cual excede en más de tres veces el requerimiento para vacas Holstein con 90 días en lactancia y produciendo 25 litros de leche según el NRC (2001) (1.00%). Dichos excesos están asociados con disfunciones en el metabolismo del Ca y del Mg (Goff, 2006). En el caso de este último, el efecto negativo de los altos niveles de K se asocian a un cambio de potencial eléctrico en el epitelio ruminal (de 30 a 50mV) (Scott, 1966; Martens y Blume, 1986) lo que puede disminuir su absorción.

Tabla 1.4 Contenido mineral en muestras de kikuyo recolectadas en Antioquia

	Macrominerales				
	P	Ca	Mg	K	S
	% de la MS				
Promedio	0.46	0.32	0.30	3.69	0.20
Máximo	0.58	0.42	0.36	5.12	0.35
Mínimo	0.28	0.21	0.22	1.68	0.08
D. E.	0.08	0.05	0.04	0.77	0.07
C. V., %	18.1	15.5	12.5	20.9	36.5
NRC 2001 [†]	0.32	0.62	0.18	1.00	0.20

[†]Requerimientos para vacas holstein con 90 días en lactancia y produciendo 25 litros de leche según el NRC (2001) (Tabla 14-7, pg 266). Adaptado de Correa *et al.* (2008)

1.1.5 Absorción y biodisponibilidad ruminal de Mg.

Varios autores (Martens y Blume, 1986; Care *et al.*, 1984; Greene *et al.*, 1983) coinciden en afirmar que el principal sitio de absorción del Mg en animales adultos es el epitelio ruminal, mientras que la porción no absorbida en rumen desaparece a nivel intestinal (Wilye *et al.*, 1985).

El pH ejerce un fuerte efecto sobre la absorción de Mg a nivel ruminal, existiendo una relación inversamente proporcional entre el pH y la solubilidad del mineral (NRC 2001). Cook *et al.* (1994) observaron una disminución en la solubilidad del Mg a medida que el pH ruminal aumentaba por encima de 6.5. Es por ello que en dietas con inclusión alta de alimentos concentrados, se puede esperar un aumento en la solubilidad del mineral.

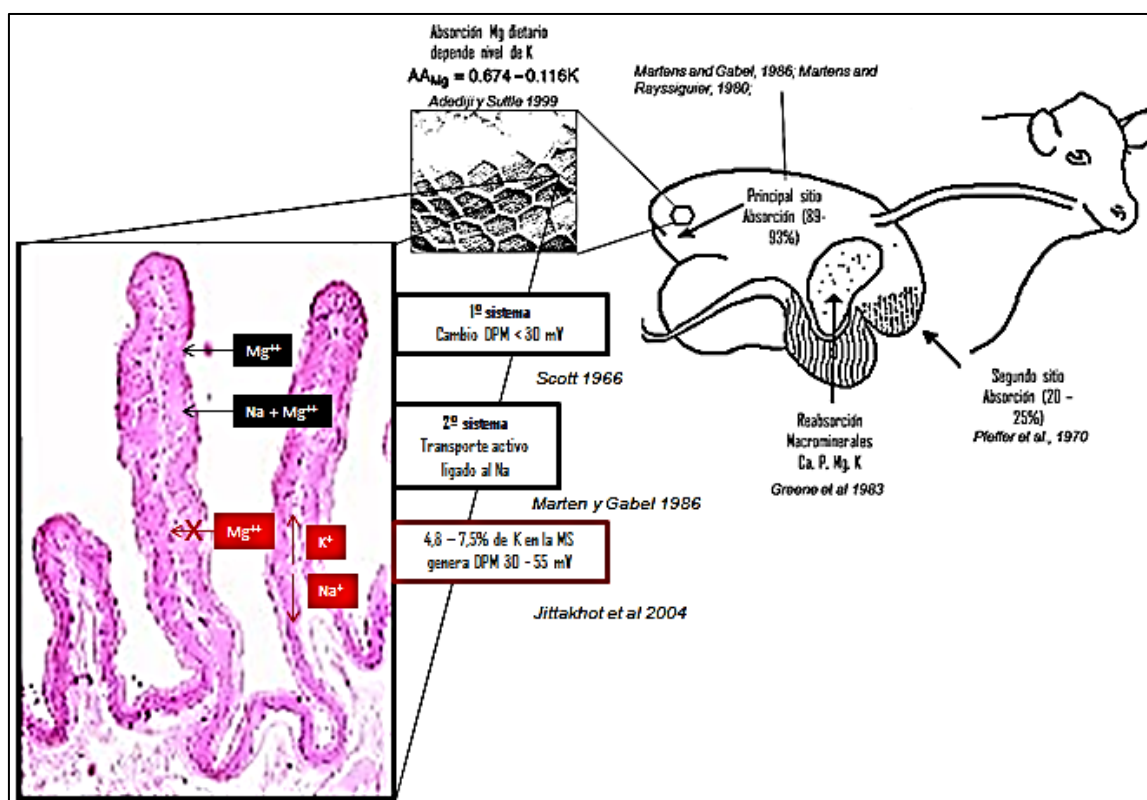
Hasta hace unas décadas numerosos autores coincidían en afirmar que el principal sitio de absorción del Mg en rumiantes era el duodeno (Fontenot *et al.* 1973, Horn y Smith 1978, Tomas y potter 1976); sin embargo, actualmente se sabe que los pre-estómagos constituyen el principal sitio de absorción del Mg (Laporte y Sykes 2004), específicamente el rumen que tiene entre 25 y 30 veces mayor capacidad de absorción que el omaso o el abomaso (Martens *et al.* 1973, Martens *et al.* 1978).

La absorción del Mg a través del epitelio ruminal se da mediante un sistema de transporte activo (Martens *et al.* 1973, Dua y Care, 1995). Marten y Harmeyer (1978) observaron en epitelio ruminal de novillas que el flujo neto de magnesio se realiza en contra de un gradiente eléctrico y que es dependiente de la presencia de una diferencia de potencial transmural.

Experimentos de Martens y Blume (1986) determinaron que el transporte facilitado del Mg a través del epitelio ruminal (aislado) puede realizarse por medio del sodio (Na). Por tanto al suministrar dietas con niveles normales de Na se puede esperar una absorción de Mg normal.

La absorción de Mg en el rumen depende de diversos factores como lo son su concentración en el medio ruminal, el nivel de K en el líquido ruminal (Fontenot et al 1973, Tomas y Potter 1976), el contenido de proteína cruda dietaria y por tanto, de amonio en rumen (Head y Rock 1955, Larvor y Guèguen 1963, Metson y Saunders 1978), así como de la integridad del medio del transporte, que en el caso del Mg, es un mecanismo activo ligado al Na (Martens y Gabel, 1986).

Esquema 1. Química Absorción y transporte del Mg en Rumiantes.



Esquema de absorción de Mg: El principal sitio de absorción en rumiantes jóvenes es el intestino delgado, sin embargo al desarrollarse el rumen este se convierte en el tejido de mayor absorción del mineral. La absorción a nivel ruminal se ve afectada por diversos factores entre los que se citan; concentración de Mg en fluido ruminal, integridad de los mecanismos de transporte de Mg, la concentración de Na, Mg y K en la dieta. A medida que aumenta el contenido de K en la dieta y por tanto en el fluido ruminal, la absorción de Mg a través de las papilas ruminales disminuye, causado por un aumento en la *diferencia de potencial de membrana (DPM)*, que puede pasar de 30 a 55 mV

Correa et al. (2008) reporta valores iniciales de liberación ruminal de Mg en pasto kikuyo superiores al 70%, relacionando este valor con un desbalance caracterizado por el exceso de proteína (específicamente de Nitrógeno no proteico) y déficit de carbohidratos estructurales, lo que en teoría permite acumulación de amonio e incluso del K en el rumen (propio del forraje). Sin

embargo, algunos datos señalan que el contenido de K se reduce rápidamente en el rumen mientras que el de otros iones como el de sodio (Na) se incrementa no obstante que su concentración en el forraje sea baja (Pino y Correa Sin publicar).

Se desconocen trabajos en los que se halla estimado la liberación ruminal del Mg a partir de fuentes Inorgánicas incubadas como sales puras y utilizando la técnica *In situ*. Van Ravenswaay et al (1989) estudió la solubilidad de MgO a nivel *In vitro* en un medio acidificado con HCl (pH 3) encontrando mayor solubilidad a menor pH. Sin embargo Jensen et al (1986) indica que los medios de cultivo para estos estudios deben tener un pH de 6 a 7 para que fueran aplicables a nivel práctico. Lough et al (1990) por su parte, observó una mayor solubilidad en proteínatos de Mg con respecto a MgO en cultivos *In vitro*.

Allcroft y Burns (1968) utilizaron MgO y MgCO₃ en dietas para novillas, al determinar los niveles séricos de Mg encontraron un mayor nivel en las novillas del tratamiento de MgO. Más adelante, Bell et al (1978) utilizaron enemas de MgCl₂ y MgSO₄ en terneros y observaron un aumento sensible en el nivel sérico de Mg en terneros que recibieron MgCl₂.

Se han reportado investigaciones relacionadas con la Biodisponibilidad del Mg contenido en forrajes, como Rye grass con altos (4,32% de la MS) contenidos en Mg (Moseley y Griffiths 1984), *Dactylis* con menos de 1,2% de la MS en Mg (Van Eys y Reid 1987) y *Bromus* rico en Mg (Gring y Males 1987). Dichos estudios coinciden en afirmar que existe una relación positiva entre el contenido de Mg en dichos forrajes y la concentración del mineral a nivel ruminal.

Por medio de la infusión Abomasal de Mg Beede et al (1989) evaluaron la solubilidad de MgO y MgPO₄ encontrando importantes diferencias entre estas fuentes (37 y 81% respectivamente). Van Eys y Reid (1987) utilizando la técnica *In situ* observaron una DMS de 93% a las 48 horas. Mientras tanto, Emanuele y Staples (1990) bajo la misma técnica e incluso adaptando una segunda incubación en pepsina (Emanuele et al 1991) al evaluar alfalfa

(*Medicago sativa*), pasto elefante (*Pennisetum purpureum*) y pasto estrella (*Cynodon dactylon*), encontraron una desaparición de Mg entre 93 y 97% a la 72h.

1.1.6 Consideraciones de la técnica *In situ*

La técnica *In situ* de la bolsa de nailón ha sido utilizada ampliamente para determinar el nivel de desaparición de forrajes y otras materias primas (Orskov *et al.*, 1980; Fine *et al.*, 1958; Hopson *et al.*, 1963). Estudios iniciales (Neathery, 1972) buscaron comparar el nivel de desaparición con los valores obtenidos en estudios de digestibilidad.

De manera general, la técnica requiere como elementos básicos una bolsa de nailón, Dacrón o poliéster con un tamaño de poro que oscila entre 30 y 50 μ m, muestras secas y molidas en cribas que varían entre 1,5 y 2,0 mm y animales fistulados que reciban una dieta que satisfaga los requerimientos de mantenimiento (Madsen y Hvelplund, 1994). No obstante, tanto la cantidad de muestra como el tamaño del poro de la bolsa, entre otros factores, varían ampliamente entre estudios (Nocek, 1985). Los materiales y procedimientos más recomendados se observan en la Tabla 1.5.

La metodología requiere la introducción de muestra seca y molida en la bolsa de nailón y su sellado por medio de abrazaderas plásticas, por calor o cordones internos en cada bolsa (Orskov *et al.*, 1980). Posteriormente, cada bolsa debe ser sometida a un lavado previo a la incubación (Lindberg y Knutsson, 1981). Normalmente se manejan entre 7 a 10 tiempos de incubación y se realiza la introducción de las bolsas empezando con el último tiempo a evaluar (Nocek, 1985). Luego del retiro de las bolsas incubadas, se realizan 3 lavados con agua del grifo y se procede a secar las bolsas (65°C por 48h) para poder estimar, posteriormente, la desaparición de la materia seca (Nocek, 1988).

A pesar de las aplicaciones y el alcance de la información que se obtiene de la técnica, Orskov *et al* (1980) han identificado limitaciones relacionadas con el hecho de que la muestra no sea masticada ni sometida al proceso de rumia, que no abandone el rumen y que únicamente sea determinada la cantidad de

muestra que abandona la bolsa, es decir, se mide la desaparición del material contenido en la bolsa aunque se presume que este se degrada por acción de las bacterias del rumen. Uden y Van Soest (1984) por su parte, han establecido numerosas fuentes de variación de la técnica, entre las que se citan el tamaño del poro, el tamaño de partícula de la muestra, la relación entre la cantidad de muestra y el tamaño de la bolsa, tiempos de incubación, uso de réplicas y la dieta suministrada.

El tamaño de poro de la bolsa es probablemente el primer factor que ha sido relacionado con alteraciones en la información obtenida. Se han reportado tamaños de poro que van desde las 5 hasta 93 μm (Vanhatalo, 1995). Van Hellen y Ellis (1977) observaron ingreso de partículas ruminales a la bolsa utilizando un tamaño de poro de 70 μm , sin embargo utilizando poro de 60 μm dicho fenómeno no fue detectado. Lindberg (1984) y Nocek (1985) coinciden en señalar la relación directamente proporcional entre el tamaño del poro y la desaparición de la materia seca o el N de la bolsa incubada. Al respecto, Uden y Van Soest (1984) recomiendan utilizar bolsas cuyo tamaño de poro sea de 30 μm ya que, según estos autores, dicho tamaño permite el ingreso bacteriano pero impide al mismo tiempo la salida excesiva de la muestra evaluada evitando, de esta manera, sobre-estimaciones de la desaparición de la misma. Nocek (1988), por su parte, recomienda un rango más amplio (40-60 μm).

Tabla 1.5. Especificaciones y recomendaciones de la técnica *In situ*

Variable	Recomendación
Tamaño poro de la bolsa	40 – 60 μm
Tamaño partícula de la muestra	Suplementos energéticos 2mm Cereales, henos, 5mm Ensilajes 5mm Forrajes 2mm*
Relación muestra : superficie bolsa	10 – 20 mg/cm ²
Dieta	Dieta que satisfaga el requerimiento de mantenimiento En raciones totalmente mezcladas (TMR) alimentación <i>ad libitum</i>
Lavados previos y posteriores	Remojado previo en agua o buffer Post incubación remojado con agua de llave hasta que el agua salga limpia.
Tiempos de incubación	De 0 a 3 horas = 3 – 6 periodos De 6 a 24 horas = 3 – 6 periodos Más de 25 horas = 6 – 12 periodos

Tomado de Nocek (1988)

* Tomado de Goering y Van Soest (1970)

Es importante considerar el tamaño del poro de la bolsa de nylon a utilizar, ya que el mismo asegura una adecuada colonización por parte de los microorganismos ruminales para la posterior degradación de la materia seca (Van der Koelen *et al.*, 1991; Ørskov *et al.*,1980; Lawrey, 1969; Mehrez y Ørskov,1977).

1.2 Liberación ruminal de fuentes inorgánicas de Mg y su relación con la enzima Gamma glutamil transferasa.

1.2.1. Técnicas de Medición de la liberación ruminal.

El estudio de la fisiología digestiva del rumen se ha apoyado en diversas metodologías, entre las que se encuentran el análisis de la desaparición de nutrientes en el ambiente ruminal y la generación de productos de la fermentación microbiana. Dichos fenómenos han sido medidos por procedimientos tales como la técnica *In situ* de la bolsa de Nylon (Ørskov *et al* 1980), la técnica de gases *In vitro* (Theodorou *et al* 1994) y el RUSITEC (Cerkawsky y Breckenridge 1977). Estas técnicas buscan, además, evaluar el valor nutricional de forrajes y utilizan como inóculo el líquido ruminal (LR). Este fluido provee valiosa información acerca de la digestión de forrajes, poblaciones bacterianas y de protozoos (Owen y Goetsch 1989), nivel de ácidos grasos volátiles, así como la presencia y actividad de algunas enzimas de interés (Faixová y Faix S. 2002). El LR de bovinos contiene tanto proteína bacteriana como enzimas, mono y disacáridos libres, macro y micro minerales (Church 1989). En el medio líquido se llevan a cabo infinidad de reacciones de fermentación y metabolismo microbiano, que definen en parte el destino y la repartición de nutrientes hacia los tejidos, incluyendo el hígado (Reynolds y Maltby 1994). Para su obtención usualmente se utilizan vacas canuladas al rumen (Posada y Noguera 2005).

No obstante, estas técnicas presentan desventajas entre las que se destacan; el alto grado de intervención en los animales experimentales (fistulación), su

alto costo, la necesidad de equipos especializados para el análisis de muestras y de personal capacitado para los mismos (Ceballos *et al.*, 2008), así como el sesgo de las variables obtenidas (desaparición materia seca, volumen de gas producido y efluentes generados con el RUSITEC). Este panorama apunta a la necesidad de la obtención de LR bovino por medio de técnicas menos invasivas con el fin de utilizarlo como inóculo para el estudio del comportamiento del medio ruminal ante diferentes tratamientos nutricionales.

Sobre el LR obtenido de animales experimentales, se llevan a cabo procesos que van desde congelación y posterior descongelación (Zeigler *et al.* 2003) liofilización y diversos tipos de filtrado (Luchini *et al.* 1996) hasta diversas velocidades de centrifugación (Hsu y Fahey 1990). Incluso se ha determinado que los microorganismos presentes en LR preservado bajo congelación y posteriormente descongelados y centrifugados poseen menor actividad proteolítica que aquellos microorganismos de LR fresco (Mayo *et al.*, 2000) debido en parte a la pérdida de microorganismos y al agotamiento de nutrientes que se produce durante el proceso de conservación y de preincubación.

Uno de los procesos vitales que llevan a cabo los microorganismos en el medio ruminal es la fijación de nitrógeno no proteico (NNP) para la síntesis de proteína verdadera (Owens y Zinn 1988, Huntington 1986, Annison y Briden 1999). Esta incorporación ruminal de compuestos nitrogenados y su posterior conversión en aminoácidos, está mediada por 4 enzimas a saber; aspartato amino Transferasa (AST), Alanino amino Transferasa (ALT), Glutamato Deshidrogenasa (GDH) y Gamma glutamil Transferasa (GGT) (Owens y Zinn 1988). Es precisamente esta última participa en la etapa inicial de incorporación de amonio a cetoácidos (Conn *et al.* 2000). Este proceso enzimático utiliza como cofactor al sistema NADH^+H^+ , produciendo una molécula de Glutamato (Pabon 2004). Adicionalmente en este sistema, iones divalentes como Co, Cu y Mg actúan como cofactores (Faixová *et al.* 2006).

1.2.2. Química, absorción y transporte de Mg en microorganismos

Se ha reconocido ampliamente el papel fundamental que cumple el Mg como cofactor de numerosas reacciones del metabolismo de carbohidratos, lípidos, fosforilación oxidativa y β -oxidación (Underwood y Suttle 1999). No obstante, el papel como cofactor en diversos sistemas enzimáticos depende más allá de la fijación del metal como tal, de la coordinación espacial para la ligación de moléculas de agua a dicho catión (Black y Cowan 1997; Cowan 1993; 1998; Suga et al 1998).

El Mg como ion, presenta una configuración geométrica única, al carecer de un electrón en el nivel d , lo que le confiere una alta capacidad de ligar moléculas de agua y forma hexámeros, con lo cual puede aumentar su radio iónico hasta un tamaño 400 veces más grande que el ion por sí solo (Kehres y Maguire 2002). Sin embargo, para su ingreso y transporte al interior de la célula, este ion debe ser deshidratado, por lo que requiere sistemas de transporte únicos. Consecuentemente para que pueda haber transporte o fijación a un sistema enzimático, el Mg requiere un sitio de ligación inicial grande y/o un medio más elaborado para deshidratar la molécula (Smith y Maguire, 2002).

El Mg en la dieta de los rumiantes proviene tanto de fuentes orgánicas, principalmente los forrajes, como de fuentes inorgánicas (sales) que presentan patrones diferentes de liberación de este mineral. En el caso de los forrajes se ha establecido que en contacto con el licor ruminal la liberación del Mg es alta y aumenta ligeramente durante las siguientes 24 horas (Correa 2007). En cuanto a las fuentes inorgánicas, la información existente sobre la liberación del Mg en el rumen es limitada. Recientemente Cuervo y Correa (sin publicar), establecieron que existe una correlación alta y positiva entre la solubilidad de las sales y la desaparición de las mismas de bolsas de nailón incubadas bajo condiciones in situ, sugiriendo que fuentes como el $MgCl_2$ y el $MgSO_4$ presentan una alta y rápida desaparición de las bolsas al contrario del comportamiento mostrado por el MgO .

Se han reconocido aproximadamente 4 sistemas de proteínas capaces de transportar cantidades importantes de Mg al Interior de microorganismos, estos son, CorA, MgtA, MgtB and MgtE (Smith *et al.*, 1993). La expresión de una u otra proteína varía entre microorganismos, en el caso de la *Salmonella typhimurium*, por ejemplo la MgtB, es el sistema más afín para la absorción y el transporte de Mg (Blattner *et al.*, 1997).

El Sistema de proteína transportadora de magnesio MgtE, es un sistema de membrana único con una estructura y secuencia sin parecido con ninguna proteína conocida. Posee una estructura de un largo terminal amino, soluble en el periplasma celular y tres segmentos trans-membranales en el terminal carboxilo. No obstante, solo el sistema CorA tiene como única función definida el transporte de Mg en bacterias y *Archaea* (Smith y Maguire, 1998)

1.2.3. Generalidades de la Gamma glutamil transferasa (GGT)

La GGT (2.3.2.2.) es una glicoproteína anclada a la superficie externa de la membrana plasmática de las células animales (Keillor, 2005). Ha sido identificada en organismos unicelulares (Sakai *et al* 1996; Xu y Strauch 1996) y en animales superiores en la mayoría de los órganos, especialmente en tejido renal (Osuji 1981; Martin y Slovin 2000).

La estructura general de la enzima presenta una cadena pesada a nivel intracelular, un dominio trans-membranal y una cadena liviana extracelular, donde se encuentra el sitio activo (Taniguchi e Ikeda 1998). Esta enzima presenta actividad catalítica tanto en el citosol como en la membrana celular y adicionalmente presenta algunas iso-enzimas (Kramer y Hoffmann 1997).

En microorganismos, la GGT participa en la fijación de NNP en forma de amonio (NH_4^+) uniéndolo a una molécula de glutamato para obtener L-glutamina; esta reacción utiliza al Mg dependiente de ATP como cofactor (Nelson y Cox, 2001). Dicha reacción tiene una importante aplicación en la nutrición de rumiantes, teniendo en cuenta que las bacterias ruminales son capaces de aprovechar el NNP proveniente de la dieta.

1.2.4. Condiciones Ruminales Vs condiciones *In vitro*.

Existen ciertas condiciones propias del rumen que no se logran simular bajo condiciones *In vitro*. Dentro de estas se encuentra el movimiento propio de las contracciones, la temperatura y humedad del medio ruminal, el intercambio de nutrientes que puede afectar la disponibilidad de nutrientes y la actividad de enzimas, así como la regulación osmótica (RUSITECVV).

A pesar de que las técnicas *In vitro* presentan la gran ventaja de estudiar la actividad microbiana fuera del control del animal hospedero (Johnson 1966), este tipo de experimentos tiene limitaciones específicas relacionadas con la ausencia de control físico y químico de la actividad normal de la flora ruminal.

La mayoría de las técnicas *In vitro* han sido utilizadas para el estudio de la degradabilidad de la materia seca en forrajes para rumiantes (Giraldo et al 2007). Las metodologías *In vitro* de Tilley y Terry (1963) y de Van Soest et al (1966), reconocen a la temperatura, humedad y pH como factores de alteración de la actividad microbiana, por lo que los simulan en el medio experimental. No obstante estas técnicas presentan demoras por la incubación individual de cada alimento (Giraldo et al 2007).

Goering y Van Soest (1979) por su parte reconocen a los movimientos ruminales como un mecanismo físico que permite la unión efectiva entre las bacterias fibrolíticas y las paredes celulares de las plantas. Es por ello que su técnica *in vitro* permite, además de una incubación simultánea de hasta 100 muestras, el movimiento continuo de cuatro recipientes de vidrio por hasta 48 horas (Ankom® 2004).

Aparte de las condiciones fisiológicas normales del rumen que pueden afectar la actividad bacteriana, Czerkawski y Breckenridge (1977) indican que el tiempo de evaluación de las técnicas *In vitro* puede no ser suficiente para el análisis de materiales fibrosos o de lenta degradación. Ellos identifican la salida de materiales volátiles (metano y ácidos grasos volátiles) y el ingreso constante de saliva al medio *In vitro*, como factores propios del rumen que pueden

mejorar el nivel de predicción de la digestibilidad de forrajes por parte de bacterias ruminales.

Por ello, con la utilización del RUSITEC (Czerkawski y Breckenridge 1977), se realizan estudios *In vitro* de forrajes con una duración de hasta 30 días, inyección constante de saliva y colecta de efluentes y materiales volátiles. Esta técnica provee a los microorganismos presentes en el medio, condiciones muy similares a las presentes en el rumen, permitiendo una actividad enzimática ideal para los mismos.

Al igual que estos autores, Theodorou et al (1994) reportan que el intercambio gaseoso es un factor que puede limitar la actividad enzimática normal de bacterias celulolíticas, limitando la degradación de la fibra por la acumulación de residuos de digestión. De tal forma que, este autor relaciona la producción de gas *in vitro* con la digestibilidad que pueda tener una materia prima para rumiantes.

1.3 . Concentración ruminal de Mg y actividad de Gamma glutamil transferasa en rumen

1.3.1. Estudios de Infusión ruminal

Los procedimientos por medio de los cuales se introducen sustancias en diferentes porciones anatómicas de animales domésticos han permitido la evaluación del efecto de diversos nutrientes en órganos específicos. Así, se han evaluado infusiones intravenosas en el sistema porta hepático (Kristensen et al 2010), en duodeno (Lemosquet et al 1997), rumen (Boudon et al 2007) y en el Hígado (Waldron et al 2003).

A nivel ruminal han sido infundidos azúcares como glucosa, lactosa y sacarosa (Giduck y Fontenot 1987, Lemosquet et al 1997 Boudon et al 2007), materiales volátiles (AGV) (Faverdin et al 1992) e incluso ácido clorhídrico (HCl) (Giduck et al 1988). Comúnmente se han utilizado materias primas completas para la alimentación animal como forrajes, granos y pajas (Neathery 1972, Payne et al 1972, Mehrez y Orskov 1977, Orskov y M^oDonald 1979), aceites (Krysl et al 1991) o se han utilizado sustancias para controlar condiciones ruminales como

NaHCO₃ (Hogue et al 1991) y algunos minerales de importancia nutricional como el K, Ca y Mg (Tomas y Poter 1975, Wilye et al 1985).

Los efectos de la infusión ruminal de macrominerales han sido ampliamente reportados (Roger y Davis 1982, Hogue et al 1991, Dalley et al 1997, Schonewille et al 1999). Dichos estudios han permitido establecer que infusiones de K en rumen, duodeno e íleon producen disminuciones en la absorción de los demás macrominerales y que, específicamente la infusión ruminal de K en forma de bicarbonato, tiene un efecto negativo sobre la absorción ruminal y total de Mg en rumiantes (Wilye et al 1985). Se ha observado, así mismo, un aumento en la excreción urinaria de Ca, Na y P a causa de la suplementación dietaria de K (Suttle y Field 1967), así como una disminución en la absorción ruminal de Mg (Jittakhot et al 2004).

La liberación ruminal de macrominerales (P, Ca, Mg y K) ha sido estudiada por medio de la incubación ruminal de forrajes (Correa 2007). No obstante, trabajos que estudien esta desaparición con sales puras son escasos. En este sentido Tomas y Poter (1975) realizaron infusiones de fuentes compuestas de Mg en forma de gluconato y acetato sobre ovejas con fistulas múltiples (rumen, omaso, abomaso, duodeno) permitiendo concluir que el principal sitio de absorción de Mg es el epitelio ruminal.

Aunque se ha establecido ampliamente que el Mg contenido en los pastos se libera rápidamente en el rumen (Correa 2007, Caro y Correa 2006), con las fuentes inorgánicas el panorama es menos claro y aunque existen varias fuentes en el mercado (Oxido de Mg, Sulfato de Mg y Cloruro de Mg) no se cuenta con trabajos publicados en los que se haya medido la liberación ruminal de este mineral y, por lo tanto, se desconoce cómo afecta la actividad enzimática y el uso del nitrógeno por parte de los microorganismos ruminales.

1.3.2. Ubicación y Funciones de la GGT

La gamma glutamil transferasa (GGT) es también conocida como gamma glutamil transpeptidasa (2.3.2.2.), una glicoproteína ligada a la superficie de la membrana en células animales (Angeli et al 2009). La misma cumple un papel importante en la transferencia de péptidos y aminoácidos a través de la pared

ruminal, así como de la formación de una reserva intracelular de glutamato y el nivel de su actividad puede regular la concentración de glutamato en las bacterias ruminales (Faixova et al 2006). Es una enzima encontrada principalmente en hígado y riñones y tiene carácter de fosfatasa alcalina; dentro de sus principales funciones esta catalizar la transferencia del residuo gamma-glutamil hacia un aminoácido aceptor (funciones de transporte similares a la de una hexoquinasa) (Campos et al 2007).

La GGT ha sido utilizada como indicador metabólico para daño hepático en animales y humanos (Church 1989, Cunningham 2003). Es una enzima proveniente del metabolismo celular y su aumento a nivel sérico es indicativo de procesos patológicos hepato-biliares (Garcia-Sanmartín y Col 2001).

Debido a que la glutamato deshidrogenasa (GDH) y la GGT están involucradas en el metabolismo del nitrógeno de los animales rumiantes, su actividad se puede ver afectada por el ambiente ruminal, específicamente por el nivel de amonio en el medio (Patterson y Hespell 1985; Pabon 2004), así como por el tipo de carbohidrato y grasa que contenga la dieta (Brooks y Lampi 1995). Patterson y Hespell (1985) por medio de experimentos *In vitro* observaron que en un medio con amonio reducido, la actividad de la glutamina sintasa (GS) (que forma un complejo con la GDH) y la ureasa tiene un marcado aumento, así como una disminución en la actividad de aminotransferasas.

Uno de los factores que determinan la regulación en la actividad de este tipo de enzimas es la cantidad total de enzima presente en el medio (Noda et al 1983; Owaga et al 1991). Adicionalmente se ha sugerido que en algunos tejidos animales (hígado de rata) la actividad de este tipo de enzimas (GDH específicamente) puede estar controlada de forma primaria por cambios en los niveles de ATP y GTP presentes (Smith et al 1975).

1.3.3 Magnesio como cofactor de la GGT

Algunos minerales actúan como componentes específicos e integrales de estructuras denominadas metalo-enzimas (Suttle 1999). En general, los minerales (principalmente macrominerales) desempeñan funciones catalíticas

en el metabolismo de los carbohidratos y de los lípidos, ácidos nucleicos y proteínas, principalmente como cofactores de una amplia variedad de enzimas (Wacker 1969). El Mg, junto con el Zn, generan una importante modulación de la enzima Glutathion Peroxidasa interviniendo en las primeras etapas del metabolismo intermedio, así como activando grupos fosfatos (Shils 1999). De igual forma ha sido relacionado con la respuesta a la acción de la insulina sobre la oxidación de la glucosa y la incorporación de lípidos (Miyazaqui, 1991). Se ha propuesto que estos iones divalentes interactúan con la fosforilación de algunas enzimas y coenzimas para potenciar las reacciones de desaminación, así como otras reacciones del metabolismo intermedio celular (Faixová y Faix 2002, Nelson y Cox 2001).

En rumiantes se han determinado diversos efectos asociados a la suplementación con sales de iones divalentes encontrando tanto efectos estimulantes (Ba^{++} y Mg^{++}) como inhibitorios (Cu^{++} , Zn^{++} , Cd^{++}) de enzimas de importancia ruminal como la ureasa (Spears y Hatfield 1978). De igual forma se han reportado efectos positivos con la suplementación de sales de iones divalentes sobre la actividad de la Alanino Amino Transferasa (ALT), Aspartato Amino Transferasa (AST), GGT y GDH (Faixova y Faix 2002), las cuales son vitales en el proceso de transaminación ruminal.

El Mg no solo participa activamente como cofactor en reacciones de fosforilación oxidativa si no, además, en procesos de transaminación como cofactor de la GGT fijando moléculas de amonio a cetoácidos receptores (como el ácido oxaloacético o α -cetoglutarato) produciendo aminoácidos como el ácido aspártico y glutámico (Conn et al 2000).

Faixová et al., (2006) utilizando líquido ruminal de ovejas fistuladas, determinaron la actividad de cuatro aminotransferasas (entre ellas GGT y GDH) por medio de kits colorimétricos, observaron que la adición de Mg bajo condiciones *in vitro* aumenta significativamente dicha actividad. Los datos recopilados por estos autores fueron comparados con actividad de las aminotransferasas medidas en ovejas LR que no recibió ninguna adición (tratamiento control).

1.3.4 Concentración ruminal de Mg

La concentración de Mg en rumen está directamente relacionada con la dieta suministrada y el volumen ruminal (Underwood y Suttle 1999) y las tasas de absorción y pasaje ruminal del mineral (Van't Klooster, 1967, Jittakhot et al 2004, Schonewille et al 1999). Se han utilizado marcadores indigeribles para calcular la tasa de pasaje ruminal de macrominerales (entre ellos Mg).

Jittakhot et al (2004) reportó que la concentración de Mg en líquido ruminal varía entre 6,7 y 13,1 x 10⁻³ mol/L, además que dicha concentración depende del nivel de Mg y K en la dieta. Scandolo et al (2007), trabajando con vacas holstein pastando praderas de Rye grass y suplementadas con 2 Kg de alimento concentrado, reportaron que el contenido de Mg en el licor ruminal osciló entre 1,9 a 2,3 x 10⁻³ mol/L, observando una correlación negativa entre el pH ruminal y la concentración de este mineral.

En este sentido, Adediji y Suttle (1999) demostraron que, tanto la especie animal, como la concentración de K en los forrajes, afectan la absorción del Mg. De tal forma que las ovejas pueden absorber hasta 3 veces más Mg que las vacas lecheras en dietas con bajo contenido de potasio. Esta propiedad puede estar relacionada con los resultados encontrados por Faixova y Faix (2002) y Faixová et al (2006). No obstante, la concentración de K afecta negativamente la absorción del Mg sin importar la especie animal.

Tabla 1.6 Volumen ruminal y Concentración de Mg en Vacas lecheras.

W (Kg)	Volumen ruminal (L) estimado	Fuente	Modelo Animal	Dieta	pH Ruminal	Concentración Mg (1x10 ⁻³ mol/L)
550	40,15	Scandolo et al 2007	Vacas Holstein canuladas multíparas, vacías, no lactantes	<i>Lolium perenne</i>	5,99 - 6,70	1,9 – 2,3
420	30,66	Johnson et al 1988	Vacas Jersey canuladas multíparas no lactantes	Concentrado comercial y Heno	5,6 - 7,2	0,5 – 6

792	53,3	Jittakhot et al 2004	Vacas Holstein canuladas multíparas, vacías, no lactantes	RTM: Heno, pasto seco y Concentrado	6,8 - 6,84	6,7 - 13,1
670	41	Schonewille et al 1999	Vacas Holstein canuladas multíparas, vacías, no lactantes	RTM: Heno, pasto seco y Concentrado	6,55 - 6,63	1,45 - 1,63

Fuente: Autor
W: Peso corporal

De igual forma, dicha concentración depende del volumen ruminal que a su vez tiene una relación positiva con el peso de los animales. Es posible que en los trabajos de Scandolo et al (2007), al igual que el trabajo de Sepulveda et al (2011) las concentraciones de Mg fueran menores que las de Jittakhot et al (2004) debido a que el peso de los animales utilizados por los primeros autores fue de aproximadamente 500Kg, mientras que el de las vacas utilizadas por los últimos fue de cerca de 792 Kg.

En la tabla 1.6, se describen algunos trabajos, en los que se calculó el volumen ruminal en bovinos, así como la concentración de Mg en rumen. Sepulveda et al (2011) por su parte, reportó que la concentración de este mineral en rumen tuvo un rango de entre 1,6 y 3,1 x 10⁻³ mol/L en vacas Holstein suplementadas con MgO.

1.4. Adición de Mg en la dieta de rumiantes y su efecto sobre el metabolismo nitrogenado.

1.4.1. Suplementación de Mg en rumiantes

En las condiciones del trópico alto colombiano, el contenido promedio de Mg para el kikuyo (*Cenchrus Pennisetum*) es de 0,27% (Correa et al 2008), mientras que en el pasto estrella (*Cynodon nlemcfuencis*) es de 0,21%. (Ver tabla 1.7). El kikuyo es el forraje más representativo de las lecherías de trópico alto en Colombia (Mojica et al 2009, Correa et al 2009), mientras que el pasto estrella es una de las principales especies forrajeras utilizadas en lecherías especializadas de trópico bajo y medio (González et al 1996) y de altura (Hernandez et al 2000, Sanchez y Soto 1997, 1999).

El consumo diario de materia seca (CMS) varía dependiendo del tipo de forraje, el modelo animal y las condiciones medioambientales (Van Soest 1994, Mayes y Dove 2000). Mientras que para vacas Holstein en trópico alto colombiano consumiendo pasto kikuyo, el CMS es de alrededor de 3,14% del peso vivo (PV) (Correa et al 2009, Leon 2011), para Vacas Jersey pastoreando praderas de Estrella, es en promedio de 2,67% del PV (González et al 1996). El promedio de CMS en trópico medio y bajo (900-1600 msnm) establecido a partir de numerosos reportes (Greenhalg et al 1966, Greenhalg y Reid 1968, Chandler 1976, Le Du et al 1979, Combellas y Hodgson 1979, Glassey et al 1980, Ruiz et al 1981, Ceballos et al 2002) es de 2,95% del PV.

El requerimiento diario de Mg para vacas lecheras adultas establecido por el NRC (2001) es de 0,2% de la MS consumida al día. Teniendo en cuenta el promedio de CMS en trópico, para una vaca lechera Holstein de 635 Kg, el aporte de Mg bajo pastoreo de Kikuyo (53 g Mg/d) o Estrella (39,3 g Mg/d) supera las recomendaciones del NRC (37,46 g Mg/d).

Tabla 1.7 Composición Química Pasto Estrella (*Cynodon nlemfuencis*)*

Componente	Unidad	Cantidad
Materia Seca	%	49,64
Cenizas	%	6,50
Proteína Cruda	%	8,34
Extracto Etéreo	%	0,85
FDN	%	81,17
FDA	%	45,43
Fibra cruda	%	20,33
Ca	%	0,37
P	%	0,30
Mg	%	0,21
K	%	1,41

* Proveniente del municipio de Aratoca – Santander.

Fuente: Laboratorio de Análisis Químico y Bromatológico - Universidad Nacional de Colombia – Sede Medellín

A pesar de este hecho, varios factores reducen la disponibilidad y absorción de Mg a nivel ruminal. En el trópico alto colombiano, el factor más limitante sería el alto contenido de K en los forrajes (Green et al 1983, Dalley et al 1997, Adediji y Suttle 1999). Es por esto que en explotaciones lecheras especializadas, la

principal fuente de suplementación de Mg es el alimento balanceado comercial. Este contiene una premezcla mineral que aporta cantidades suficientes de Mg a la dieta (Thomas et al 1984). El aporte de Mg por parte de los suplementos alimenticios varía notablemente ya que mientras que los granos de cereales contienen en promedio 0,12% en base seca, las tortas de oleaginosas alcanzan valores de 0,44% (MAFF 1992).

En sus inicios, la suplementación de Mg fue utilizada para contrarrestar los problemas generados por la tetania de los pastos típica en países de zonas templadas, relacionando este desorden con periodos de crecimiento rápido del pasto (Kruse et al 1932, Blumer et al 1939). En este sentido, numerosos autores han resaltado el efecto negativo de los altos niveles de K en los forrajes, sobre la aparición de hipomagnesemia (Sjollema 1932, Suttle y Field 1967, Schonewille et al 1999, Jittakhot et al 2004).

Entre los efectos positivos de la suplementación con Mg también se reporta la corrección del síndrome de caída de grasa en leche, utilizando principalmente óxido de magnesio (MgO) (Xin et al 1980). Este compuesto por tener alta capacidad bufferizante, permite mantener un pH básico-neutro en el rumen controlando así la cantidad y tipo de ácidos grasos volátiles ruminales, evitando así la caída del contenido de grasa en leche. Erdman et al (1980), por su parte, utilizaron $MgCO_3$ para generar un aumento de aniones en dietas para vacas secas con la finalidad de reducir la depresión de grasa en la leche. Rauch et al (2012) por su parte, reportan el efecto buffer de este mismo compuesto para vacas Holstein de alta producción. El suministro de forrajes con bajo contenido de K es otra estrategia que se ha utilizado para disminuir la diferencia catión-anión, como por ejemplo Heno de *Phleum pratense* (Charbonneau et al 2008).

Otras fuentes de Mg han sido utilizadas más como fuente de este catión que por su efecto buffer. Es así como Wilson (1980) y Holtenius et al (2008) adicionaron $MgCl_2$ y $MgSO_4$ en dietas totalmente mezcladas (TMR) como tratamiento para la hipomagnesemia de Vacas Holstein y Rojas Suizas.

1.4.2. Niveles tóxicos de Mg dietario.

El nivel de Mg suplementado en dietas para ganado lechero puede alcanzar niveles de hasta 0,4 y 0,5% en base seca (NRC 2001). No obstante, Van Mosel et al (1990) utilizaron en vacas lecheras niveles de 0,61% sin generar efectos negativos reportados previamente, como diarrea o disminución del CMS.

Gentry et al (1978), al suplementar 25 y 47g de MgO por Kg de MS, observaron efectos nocivos como diarrea, resequedad y degeneración severa del epitelio estratificado del rumen, mientras que Chester y Jones (1989) suplementando MgO en una dosis de 14g de Mg / Kg MS observaron efectos medianamente tóxicos.

Underwood y Suttle (1999), afirman que la inexistencia de un mecanismo de control metabólico del Mg puede ser indicio de una alta tolerancia a consumos extremos. Sin embargo numerosos estudios indican los peligros de altas suplementaciones de Mg. Dichos reportes se resumen en la tabla 1.8.

Los mecanismos de absorción ruminal de Mg, también parecen indicar tolerancia a altas cantidades del mineral en la dieta. Uno de los mecanismos es pasivo y no saturable (Roth y Werner 1979, Martens 1983) presentándose en dietas con altos contenidos de K. El otro mecanismo (activo y saturable) se presenta en consumos bajos de Mg (Thomas 1983). Por tanto, estos procesos pueden indicar que la absorción (y por tanto la disponibilidad) de Mg en rumiantes está íntimamente ligado al contenido de K más que de Mg en la dieta.

Tabla 1.8. Niveles de Suplementación experimental de Mg y efectos en Rumiantes

Autor y Año	Fuente Mg	Cantidad (g de Mg /Kg de MS)	Modelo animal	Efecto
<i>Chester-Jones et al</i> <i>1990</i>	MgO	25 – 47	Novillas	Diarrea, Daño epitelio ruminal
<i>Gentry et al 1978</i>	MgO	13	Novillas	Pérdida de Apetito
<i>Ebel y Gunther</i>	MgO - MgSO ₄	47	Novillas	Parálisis

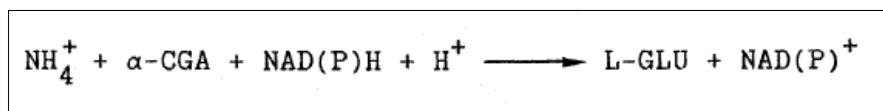
1980				Muscular
Suttle y Brebner	MgSO ₄ y MgCl ₂	130	Corderos	Diarrea
1995				Prominente
James y Chandran	MgO, MgCO ₃	Excesivas	Cabras	Urolitiasis
1975			Adultas	
Chester-Jones et al	MgO	24	Novillas	Urolitiasis
1989				
Chester-Jones et al	MgO	47	Terneros	Urolitiasis
1990				

Fuente: Autor.

1.4.3. Relación entre la GGT y el metabolismo nitrogenado ruminal

Se han descrito dos vías enzimáticas por las cuales, algunos microorganismos son capaces de convertir N inorgánico (en forma de amonio o nitrato) en orgánico (aminoácidos), la primera de las cuales, y quizás más importante, involucra la enzima glutamato deshidrogenasa (GDH) que cataliza la siguiente reacción:

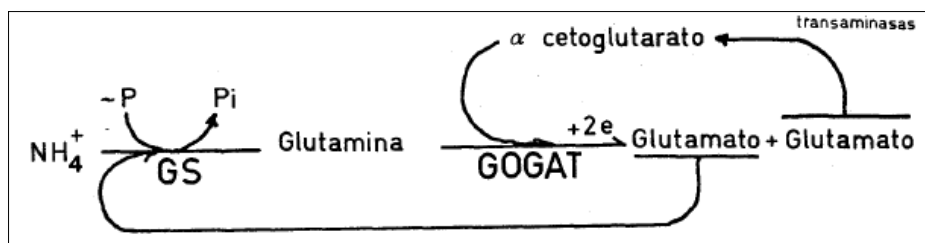
Figura 1.1. Asimilación de amonio en microorganismos por la vía GDH



En esta reacción se obtiene glutamato por medio de la adición de NH₄⁺ a un esqueleto carbonado representado por el α-ceto-glutarato y con la utilización del NADPH como cofactor. (Marques 1988).

En la otra vía metabólica interviene la glutamina sintetasa (GS) y la glutamato sintasa (GOGAT). En esta reacción el NH₄⁺ es incorporado a la glutamina y luego es transferido al α-ceto-glutarato en la posición α (Wolk et al 1976, Meeks et al 1978). La reacción general se muestra a continuación:

Figura 1.2. Asimilación de amonio en microorganismos por la vía GS-GOGAT



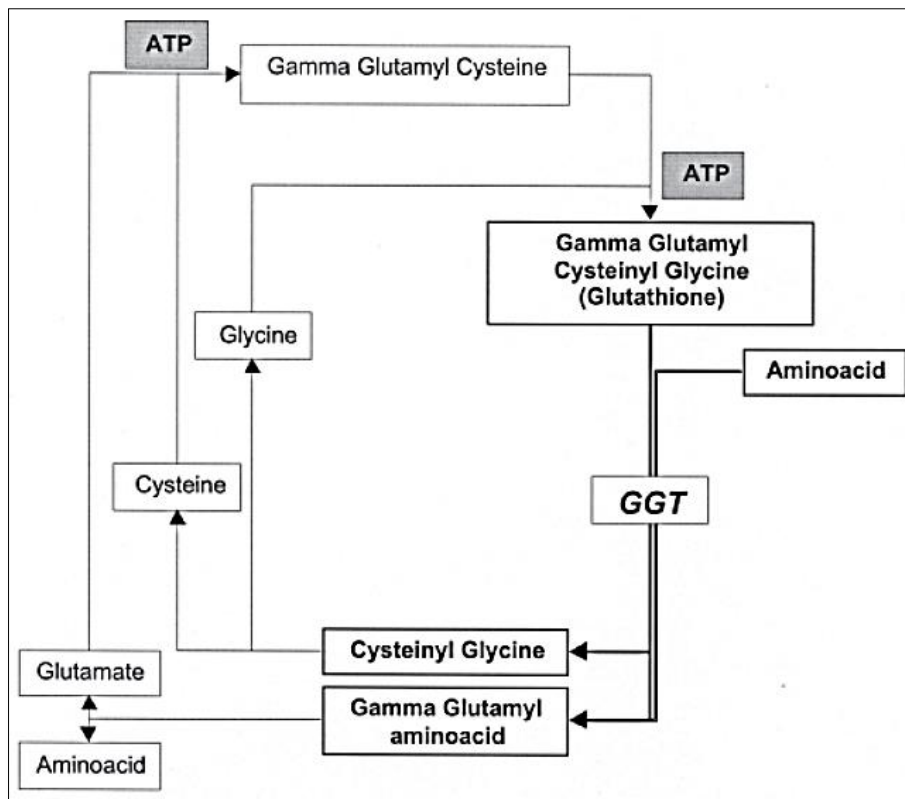
A nivel ruminal, estas enzimas (GGT, GDH y GS, GOGAT) reciben especial atención por su participación en el proceso de fijación de Nitrógeno no proteico (NNP) en forma de amonio al ligarlo a un cetoadido (Nelson y Cox 2001, Pabon 2004). El aminoácido resultante de cualquiera de los dos procesos, puede ser incorporado a la proteína que compone a los microorganismos ruminales (Hoshino et al 1996, Van Soest 1994).

La gamma glutamil transferasa (GGT) es una enzima de control alostérico y de carácter ubicuo en tejidos animales (Rico et al 1977). Su función general es la transaminación de un cetoadido, transfiriendo péptidos y aminoácidos a través de la pared ruminal y otras membranas biológicas incluyendo la de microorganismos (Nakayama et al 1994)

La GGT juega un papel importante en el transporte de aminoácidos, a través de una secuencia de reacciones que forman un ciclo "gamma-glutamil". (Whitfield 2001). En humanos ha sido identificada en tejidos de importante función transportadora como los riñones y los conductos biliares (Hanigan y Frierson 1996.).

Sin embargo, su principal función es la de dividir la molécula del Glutation en sus aminoácidos constituyentes a nivel de la membrana celular, así como el transporte de los mismos hacia el citoplasma (Whitfield 2001). En los hepatocitos, la GGT transporta una molécula de glutatión desde el exterior celular hacia el citoplasma dividiéndolo en un aminoácido con un residuo gamma glutamil (GGAA) y una molécula de cisteinil glicina (Rodwell y Kenelly 2003). El GGAA puede ser posteriormente convertido a Acido glutámico y glutamina. (Ver Figura 1.3)

Figura 1.3. Reacciones del ciclo “gamma glutamil” – Rompimiento y Síntesis de Glutathione.



Tomado de Whitfield 2001.

La síntesis de uno u otro aminoácido (glutamato o glutamina) es mediada por la vía enzimática de la GDH o la de la glutamina sintetasa (GS-GOGAT) (Nelson y Cox 2001). El glutamato por su parte, juega un papel central en el metabolismo del N en mamíferos superiores y microorganismos ya que cumple el papel de donante y receptor de grupos aminos (NH_2^-) (Chen y Rusell 1989, Paster et al 1993, Nelson y Cox 2001, Pabón 2004).

En las bacterias el amonio es asimilado hasta ser convertido en aminoácidos vía glutamato y por intermediación de aminotransferasas (Lightfoot et al 1988, Conn et al 2001). Se ha postulado que la concentración de GGT puede regular el *pool* intracelular de glutamato en bacterias ruminales (Faixová et al 2006).

El ciclo descrito en la figura 1.2 utiliza como cofactor al sistema $\text{NADH}+\text{H}^+$, produciendo una molécula de Glutamato (Nelson y Cox 2001). Adicionalmente en este sistema, iones divalentes como Co, Cu y Mg pueden actuar como cofactores (Faixova et al 2006, Arelovich 2008). La adición *In vitro* de Mg aumenta la actividad de esta y otras enzimas involucradas en procesos de

transaminación (Durand y Kawashima 1980, Faixová y Faix 2002, Faixová et al 2006).

Es posible por tanto, que una mayor actividad de la GGT produjera un aumento en la disponibilidad de sustratos para otras aminotransferasas responsables de la fijación de amonio a nivel ruminal. Sin embargo ninguno de los estudios previamente citados, ha reportado de manera concluyente que el cambio en la actividad enzimática, altere la producción de amonio a nivel ruminal, sanguíneo o lácteo.

1.4.4. Nitrógeno ureico en Leche y sangre

Se ha demostrado que el nivel de amonio producido a nivel ruminal está íntimamente relacionado con el nivel de nitrógeno ureico en sangre (NUS ó BUN por sus siglas en Ingles) (Preston et al 1961, Preston et al 1964, Ropstad et al 1989, Gustafsson y Palmquist 1993). De igual forma, el NUS guarda una estrecha relación con la concentración de nitrógeno ureico presente en la leche (Hammond 1994, Leng 1992). Varios reportes han demostrado una relación positiva y directa entre el NUL y el NUS ($r^2=0,74$) (Broderick 1995, Oltner y Wiktorsson 1983).

En este sentido, tanto el NUS ($r^2=0,98$) como el NUL ($r^2=0,59$) están directamente relacionados con el contenido de proteína cruda en la dieta (Preston et al 1964, Broderick 1995) así como su utilización a nivel ruminal (Roseler et al 1993, Socha et al 2005) toda vez que el exceso de proteína dietaria puede generar en rumiantes un exceso de urea exportada al hígado y excretada por orina y leche (Jordan et al 1983, Van Soest 1994, Jonker et al 1998, Annison y Briden 1999)

Por tal motivo, el monitoreo de los niveles de nitrógeno ureico en leche (NUL), se constituye en un posible indicador del consumo y de la degradación de la proteína de la dieta (Hammond 1994). La medición del NUL es actualmente una herramienta de amplio uso en los hatos especializados en producción de leche, debido a que la urea es un metabolito que está afectado por factores de tipo nutricional como el porcentaje de proteína, cantidad de carbohidratos

solubles y la relación proteína: energía metabolizable (EM) (Leng 1992, Rowlands 1978).

A pesar de la significancia de los niveles de nitrógeno ureico en sangre (NUS), este no es el único metabolito que indica la degradación de la proteína dietaria y la producción de amonio en rumen. El aminoácido arginina es otro compuesto que puede transportar moléculas de urea entre tejidos (Oba et al 2004) y es utilizado en algunos estudios como indicador del balance proteico de la dieta (Caro y Correa 2006, Monsalve 2004). Esto puede indicar en algunos estudios las diferencias encontradas entre los niveles de N excretado en leche u orina y el contenido de PC en la dieta (Hojman et al 2004, Bonano et al 2008, Miglior et al 2007).

1.4.5. Metabolismo Nitrogenado en el rumen durante el parto.

En este estado fisiológico, el metabolismo ruminal y la eficiencia en el uso de N a nivel ruminal depende del tipo de poblaciones bacterianas (Hungate 1968, Goat et al 1998, Fernando et al 2010), el pH ruminal (Preston et al 1964, Van Soest 1994, Veth et al 1999, Pan et al 2003), la disponibilidad de sustratos para la síntesis de aminoácidos (McLaren 1964, Alison 1969) y la disponibilidad de cofactores enzimáticos (Faixová y Faix 2002 y Faixová et al 2006).

Se ha determinado efecto del pH sobre el metabolismo nitrogenado al observar que; con un pH de 6,35 se aumentaba la digestibilidad de la fibra en forrajes secos debido a un aumento en las poblaciones fibrolíticas, mientras que a un pH de 6,13 se aumentaba la síntesis microbial de proteína. (De Veth et al 1999) asociado a cambios en el tipo de poblaciones microbiales, especialmente las amilolíticas y proteolíticas.

Los cambios de pH en el periodo parto están relacionados, según Correa (2001) con una adaptación de bacterias ruminales a una dieta más energética, como la que recibirá el animal al inicio de la lactancia. Esta adaptación es una de las funciones básicas que deben ser cuidadas en el parto para disminuir la incidencia de desórdenes posparto. En algunas explotaciones las vacas secas (mayor a siete meses de gestación) reciben una dieta pobre basada en forrajes fibrosos e incluso residuos de ensilaje (García 2009). Por ello, el aporte

de carbohidratos no estructurales como el almidón puede ser muy bajo. Annyson y Briden (1999) señalan que una disminución en la disponibilidad de almidón a nivel ruminal, reduce drásticamente la síntesis de proteína microbial.

Las poblaciones microbianas del rumen se ven afectadas por los cambios en el contenido de la dieta de vacas preparto. Este tipo de dieta puede tener hasta 12% de proteína cruda (PC) en base seca (NRC 2001), menos de 1,26 Mcal de ENI / Kg MS (Drackley 1999, Dan et al 2005, 2006), 64% de Fibra detergente neutro (FDN) y 30% de fibra detergente ácido (FDA) (Correa et al 2009). Giri et al (2005) reportaron una menor cantidad de protozoarios ciliados en rumen con dietas pobres en proteína y altas en FDA.

Pan et al (2003) por su parte, reportan bajos niveles de amonio ruminal, pH y de ácidos grasos volátiles totales en dietas basadas en forrajes fibrosos (73,9% FDN) y con bajo contenido proteico (7% PC). Dietas con contenido bajo de granos y alto de forraje fibroso (<2 Mcal EM /Kg de MS) mostraron un aumento en las poblaciones de bacterias fibrolíticas, tales como *Butyrivibrio fibrisolvens* y *Fibrobacter succinogenes* (Fernando et al 2010).

Estos cambios en las poblaciones, alteran de manera negativa el metabolismo de carbohidratos y proteínas a nivel ruminal (Weimer et al 1988). Moller 1996, señala que una alteración en la composición de fibra de la dieta (disminución en FDN y en carbohidratos solubles) no permite el correcto aprovechamiento de la proteína dietaria.

A pesar que cerca del 82% de las bacterias ruminales pueden utilizar al amonio como su única o principal fuente de N para crecer (Bryant y Robinson 1962, Allison 1969, Van Soest 1994) bajo el régimen alimenticio de vacas secas preparto, es posible que la disponibilidad ruminal de N, así como su utilización sea bajo.

Algunos autores (Fiems et al 1999, Valkeners et al 2006, 2008, Zabala 2000) han postulado que el balance entre proteína degradable en rumen y energía de la dieta, afecta directamente el metabolismo ruminal toda vez que dicha relación cambia las poblaciones de microorganismos así como las condiciones del rumen. Pardo et al (2008), concluyeron que relaciones bajas (27 y 28) entre

proteína cruda (PC) y energía metabolizable (EM) en la dieta de vacas lecheras en trópico alto, disminuyen la cantidad de amonio ruminal, NUL, NUS y proteína producida en rumen, pudiendo indicar que este desbalance dietario afecta el metabolismo proteico de rumiantes.

Sin embargo, los resultados de Clarck et al (1992) no muestran un efecto directo entre la relación N y energía en la dieta y la síntesis microbiana, producción de amonio o excreción de N. De esta forma, la información sobre el balance ideal entre N y energía en la dieta para optimizar el metabolismo nitrogenado ruminal no es consistente, debido a que estos nutrientes deben satisfacer el requerimiento del animal y del microorganismo (Owen y Goetsch 1989).

Otro factor que afecta negativamente la disponibilidad y metabolismo de N a nivel ruminal, es la caída abrupta del consumo de materia seca (CMS) a partir de la tercera semana preparto, lo que disminuye el ingreso de nutrientes para el animal y el feto (Bertics et al 1992, Hutjens 1999). Este fenómeno hace parte de un periodo denominado “de transición” en el que, cambios hormonales, metabólicos y enzimáticos permiten una caída sostenida del CMS, del peso vivo y la ganancia diaria de peso de la vaca (Drackley et al 2005). Esta disminución en la ingesta de alimento genera aumento en el pH ruminal, cambios en el patrón de producción de AGV y de poblaciones ruminales, lo que resulta en un cambio en los principales metabolitos energéticos y proteicos del animal (Douglas et al 2006).

Bajo las condiciones de manejo de las vacas preparto en hatos lecheros tradicionales y teniendo en cuenta las condiciones propias de este periodo productivo del animal, el metabolismo tanto energético como protéico se ve afectado por cambios en el ambiente ruminal (pH y perfil de AGV) que condiciona las poblaciones microbianas (cantidad y tipo) presentes en el rumen lo cual a su vez cambia la cantidad de AGV y amonio producidos en el mismo.

1.5. Bibliografía citada.

1. Adediji, O. and Suttle, N.F. 1999 Influence of diet type, potassium and animal species on the absorption of magnesium by ruminants. *Proceedings of the Nutrition Society* 58, 31A
2. Ahola J. K. Baker D. Burns P. Mortimer R. Enns R. Whittier J. Geary T and Engle T. 2004. Effect of copper, zinc, and manganese supplementation and source on reproduction, mineral status, and performance in grazing beef cattle over a two-year period^{1, 2, 3}. *J. Anim. Sci.* 2004. 82:2375–2383
3. Aikawa, J. K. 1981. Magnesium. Its biological significance. CRC Press, Boca Raton, FL.
4. Allen, V. G. and J. P. Fontenot. 1984. Influence of aluminum as sulfate, chloride and citrate (m magnesium and calcium metabolism in shccp. J, Anita. Sci. 59:798.
5. Akers R and Denbow D. 2008. Anatomy and Physiology of domestic animals Cap: 6, 138. Blackwell Publishing Ltd.
6. Allcroft, R and K. N. Burns. 1968. Hypomagnesemia in cattle. N. 2. *Vet. J.* 16:109.
7. Allison M. 1969. Biosynthesis of Amino Acids by Ruminal Microorganisms. *J Anim Sci* 1969, 29:797-807.
8. Allison RD, Meister A. 1981. Evidence that transpeptidation is a significant function of gamma-glutamyl transpeptidase. *J Biol Chem.* 1981; 256:2988–2992. [PubMed: 6110666]
9. Allison RD. 1985. Gamma-Glutamyl transpeptidase: kinetics and mechanism. *Methods Enzymol.* 1985; 113:419–437. [PubMed: 2868391]
10. Alvarado S. Arreaza L. Torregoza L. 2000. Estrategias de alimentación en confinamiento para novillas de levante doble propósito f2 durante la época seca utilizando ensilaje de maíz más suplemento. *MVZ - CÓRDOBA* 2000; 5:(2), 36.
11. Ankom Technology. 2004. Procedures for fiber and in vitro analysis. URL: [hpt://www.ankom.com/homepage.html](http://www.ankom.com/homepage.html).
12. Anison E. Briden W. 1999. Perspectives on ruminant nutrition and metabolism. II. Metabolism in ruminant tissues. *Nutrition Research Reviews* (1999), 12, 147±177 147
13. ARC 1980. The Nutrient Requirements of Ruminant Livestock. Commonwealth Agricultural Bureaux, Farnham Royal, Slough, UK, pp. 201–211.
14. Arias L. Chamorro D. 2009. Evaluación de la producción de biomasa y la calidad nutricional de dos arreglos silvopastoriles multiestrato, Parte II. *Rev Colomb Cienc Pecu* 2009; 22:3

15. Askew E. Benson J. Thomas J. Emery R. 1971. Metabolism of Fatty Acids by Mammary Glands of Cows Fed Normal, Restricted Roughage, or Magnesium Oxide Supplemented Rations. *Journal of Dairy Science*, Volume 54, Issue 6, June 1971, Pages 854–862
16. Atteh JO, Leeson S. 1983. Influence of increasing dietary calcium and magnesium content of the drinking water on performance and bone and plasma minerals of broiler chickens. *Poultry Sci* 62:869
17. Atteh JO, Leeson S. 1986. Influence of increasing dietary calcium and magnesium levels on performance mineral metabolism and egg mineral content of laying hens. *Poultry Sci* 64:1261–1268.
18. Back W. Cherry R. Hanshaw B. 1966. chemical equilibrium between water and minerals of a carbonate aquifer. *Nat. Speleol. Soc. Bull.* 28 (3); 119-126
19. Beatty D. Barnes A. Taylor E. Maloney S. 2008. Do changes in feed intake or ambient temperature cause changes in cattle rumen temperature relative to core temperature?. *Journal of Thermal Biology*, Volume 33, Issue 1, January 2008, Pages 12–19. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtherbio.2007.09.002>
20. Beede D. Hirschert E. Lough D. Sanchez W. Wang C. 1989. Solubility of magnesium from feed grade sources in an in vitro ruminal + abomasal system. In proceedings of the 26th florida dairy production conference. Pp 45—4., Univeersity of florida Gainesville.
21. Beleta J, Gella FJ. 1990. Metodo recomendado para la eterminacion en rutina de la concentracion catalitica de la γ -glutamilttransferasa en suero sanguíneo humano. *Quim Clin* 1990; 9:58-61
22. Bell M. Oluokun J. Ramsey N. Beckman G. 1978. Magnesium treatment of cows for grass tetany. *Feedstuffs* 50(6)24.
23. Bender D, Mayes P. 2003 *Vitamins & Minerals*. In Harper's Illustrated Biochemistry. Cap 45 p489
24. Betancur J F y Trujillo L G 2004 Balance de nitrógeno en vacas lecheras de alta producción alimentadas con pasto kikuyo (*Pennisetum clandestinum*) y dos niveles de suplementación de proteína no degradable en el rumen. Trabajo de grado de Zootecnia, Departamento de Producción Animal, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia, Medellín. 30p.
25. Bhatia S. Pradhan K. and Singh R. 1978. Microbial Transaminase Activities and Their Relationship with Bovine Rumen Metabolites. 1979 *J Dairy Sci* 62:441-446
26. Bispo S. Ferreira M. Vêras A. Viera A. Silva R. Pimentel M. 2007. Palma forrageira em substituição ao feno de capim-elefante. Efeito sobre consumo, digestibilidade e características de fermentação ruminal em ovinos . *R. Bras. Zootec.*, v.36, n.6, p.1902-1909, 2007
27. Black CB, Cowan JA. 1997. Inert chromium and cobalt complexes as probes of magnesium-dependent enzymes. Evaluation of the

- mechanistic role of the essential metal cofactor in Escherichia coli exonuclease III. *Eur J Biochem* 243, 684–689.
28. Blattner, F. Bloch G. Perna C. Burland N. Riley V. 1997. The complete genome sequence of Escherichia coli K-12. *Science* 277: 1453–1462.
 29. Boling, J.A., Okolo, T.O., Gay, N. and Bradley, N.W. 1979. Effect of magnesium and energy supplementation on blood constituents of fall-calving beef cows. *Journal of Animal Science* 48, 1209–1215.
 30. Boudon A. Faverdin R. Delagarde P. Lambertson J. Peyraud L. 2006. Effects of Rumen or Duodenal Glucose Infusions on Intake in Dairy Cows Fed Fresh Perennial Ryegrass Indoors. *JDS*.2006-632
 31. Braga P. Mannarino S. Eleutherio E. 2009. Glutathione and gamma-glutamyl transferases are involved in the formation of cadmium–glutathione complex. *FEBS Letters*, Volume 583, Issue 9, 6 May 2009, Pages 1489–1492. <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2009.03.066>
 32. Brod D. Kolsen K. Brent B. 1982. Effect of Water Temperature in Rumen Temperature, Digestion and Rumen Fermentation in Sheep. *J ANIM SCI* 1982, 54:179-182.
 33. Brooks S. Lampi B. 1995. The effect of changing dietary fat and carbohydrate on the enzymes of amino acid metabolism. *Journal of nutritional biochemistry* Vol 6(8) p414-421.
 34. Burroughs, W., W. P. Gerlaugh, B. H. Edgington, and R. M. Bethke. 1949. The influence of corn starch upon roughage digestion in cattle. *J. Anita. Sci.* 8:271
 35. Campos R. Cubillos C. Rodas A. 2007. Indicadores metabólicos en razas lecheras especializadas en condiciones tropicales en Colombia. *Acta Agron (Colombia)* Vol 56(2) 2007. P 85-92.
 36. Canchila E. Posada R. Barbosa H. 2009. Evaluación de la degradabilidad in situ de la materia seca del fruto de palma de aceite y la pollinaza en animales bovinos. *Rev Colomb Cienc Pecu* 2009; 22:3
 37. Cárdenas P. Machado J. 2012. Evaluación del consumo de sal de los bovinos de la finca rivera CORHUILA. *Revista Conocimiento*. Volumen V Número I Diciembre de 2012.
 38. Care A. Brown R. Farrar A. 1984. Magnesium absorption from the digestive tract of sheep. July 1, 1984 *Experimental Physiology*, 69, 577-587.
 39. Caro y Correa 2006. Digestibilidad posruminal aparente de la materia seca, la proteína cruda y cuatro macrominerales en el pasto kikuyo (*pennisetum clandestinum*) cosechado a dos edades de rebrote. *Livestock research for rural development* 18 (10)
 40. Carro M. López S. González J. Valdés C. Bochi-Brum O. 1999. Digestibilidad in vitro de forrajes y concentrados efecto de la ración de los animales donantes de líquido ruminal. *Archivos de zootecnia*, ISSN 0004-0592, Vol. 48, N° 181, 1999 , págs. 51-61

41. Carruthers, V.R. & Neil, P.G., 1997. Milk production and ruminal metabolites from cows offered two pasture diets supplemented with non-structural carbohydrate. *N. Z. J. Agric. Res.* 40, 513-521.
42. Carulla J E, Cárdenas E, Sánchez N y Riveros C 2004 Valor nutricional de los forrajes más usados en los sistemas de producción lechera especializada de la zona andina colombiana; En: *Eventos y Asesorías Agropecuarias EU* (ed.), Seminario Nacional de Lechería Especializada: “Bases Nutricionales y su Impacto en la Productividad”. Medellín, septiembre 1 y 2: 21 – 38.
43. Castillo-Lopez E. Kononoff P and Miner J. 2013. The impact of DDGS on presence of ruminal bacteria, ruminal protozoa and yeast during in vitro fermentation. University of Nebraska – Lincoln USA. <http://freepdfdb.com/pdf/the-impact-of-ddgs-on-presence-of-ruminal-bacteria-ruminal-66487427.html>
44. Ceballos A. Noguera R, Bolívar D. Posada S. 2008. Comparación de las técnicas in situ de los sacos de nylon e in vitro (DaisyII) para estimar la cinética de degradación de alimentos para rumiantes. *Livestock Research for Rural Development* 20 (7)
45. Ceballos A. Villa N. Betancourth Tania. Roncancio D. 2004. Determinación de la concentración de calcio, fósforo y magnesio en el periparto de vacas lecheras en Manizales, Colombia. *Rev Col Cienc Pec* Vol. 17:2, 2004
46. Cecava M, Merchen N, Gay L, Berger L. 1990. Composition of Ruminal Bacteria Harvested from Steers as Influenced by Dietary Energy Level, Feeding Frequency, and Isolation Techniques. *J. Dairy Sci* 73:2480-2488
47. Chalupa, W., J. Clark, P. Opliger, and R. Lavker. 1970. Ammonia metabolism in rumen bacteria and mucosa from sheep fed soy protein or urea. *J. Nutr.* 100:161.
48. Chaudry A. Mohamed R. 2012. Fresh or frozen rumen contents from slaughtered cattle to estimate in vitro degradation of two contrasting feeds. *Czech J. Anim. Sci.*, 57, 2012 (6): 265–273.
49. Chemisquy A. Giussani L. Scataglini M. Kellog E. Morrone O. 2010. Phylogenetic studies favour the unification of *Pennisetum*, *Cenchrus* and *Odontelytrum* (Poaceae): a combined nuclear, plastid and morphological analysis, and nomenclatural combinations in *Cenchrus*. *Annals of botany.* 2010 Vol 106 Issue 1, Pages 107-130.
50. Chester-Jones, H., Fontenot, J.P., Veit, H.P. and Webb, K.E. 1989. Physiological effects of feeding high levels of magnesium to sheep. *Journal of Animal Science* 67, 1070–1081.
51. Church. D. 1989. *E.El rumiante, fisiología digestiva y nutrición.* Ed Acribia 1989.p, cap. 8; 168-172, Cap. 3; 283
52. Clark J. Klusmeyer H. Cameron M. 1992. Microbial Protein Synthesis and Flows of Nitrogen Fractions to the Duodenum of Dairy Cows. En:

- Symposium: Nitrogen Metabolism And Amino Acid Nutrition In Dairy Cattle. 1992 J Dairy Sci 75:2304-2323
53. Cole N. Todd R. 2007. Opportunities to enhance performance and efficiency through nutrient synchrony in concentrate-fed ruminants. J Anim Sci April 2008 vol. 86 no. 14 suppl E318-E333.
 54. Cole NA. 2000. Changes in postprandial plasma and extracellular and ruminal fluid volumes in wethers fed or unfed for 72 hours. J Anim Sci 78, 216-223.
 55. Conn E. Stumpf P. Bruening G. Doi R. 2000. Bioquímica Fundamental. 5ta edición. ISBN 968-18-5231-1.
 56. Consejo Regional de la Cadena Láctea de Antioquia 2001 Acuerdo de competitividad de la cadena láctea de Antioquia; Medellín. 75 p www.agrocadenas.gov.co/documentos/documentos_iica/No%2020.pdf
 57. Consejo Regional de la Cadena Láctea de Antioquia 2001. Acuerdo de competitividad de la cadena láctea de Antioquia; Medellín. 75 p www.agrocadenas.gov.co/documentos/documentos_iica/No%2020.pdf
 58. Cook N. Nordlund K. Oetzel G. 2004. Environmental Influences on Claw Horn Lesions Associated with Laminitis and Subacute Ruminant Acidosis in Dairy Cows. Journal of Dairy Science, Volume 87, Supplement, July 2004, Pages E36–E46.
 59. Correa C H J, M L Pabón R, Sánchez de G M Y y J E Carulla F 2011. Efecto del nivel de suplementación sobre el balance y eficiencia en el uso del nitrógeno en vacas Holstein de primero y segundo tercio de lactancia bajo condiciones de pastoreo en el trópico alto de Antioquia. Livestock Research for Rural Development 23.
 60. Correa C, M L Pabón R* y J E Carulla F. 2008. Valor nutricional del pasto kikuyo (*Pennisetum clandestinum* Hoechst Ex Chiov.) para la producción de leche en Colombia (Una revisión): I - Composición química y digestibilidad ruminal y posruminal. Livestock Research for Rural Development 20 (4) 2008
 61. Correa H J 2007 Cinética de la liberación ruminal de macrominerales en pasto kikuyo (*Pennisetum clandestinum*) cosechado a dos edades de rebrote. Livestock Research for Rural Development. Volume 18, Article # 31 Retrieved junio 17, 2006, from
 62. Correa H. 2001. Caracterización del periodo de transición. curso de educación continuada: Nutrición y alimentación de la vaca en transición. Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín. Contenido en línea. <http://www.agro.unalmed.edu.co/v2/departamentos/panimal/docs/caracterizatransi.pdf>
 63. Correa H. 2009. Producción de leche con base en pasturas: el caso de los hatos especializados en Colombia. Revista Facultad Nacional de Agronomía. Medellín, Vol 62 (Supl. 1): 1-5. ISSN: 0304-2847
 64. Correa H. Rodríguez Y. Pabon M. Carulla J. 2012. Efecto de la oferta de pasto kikuyo (*Pennisetum clandestinum*) sobre la producción, la calidad

- de la leche y el balance de nitrógeno en vacas Holstein. *Livestock Research for Rural Development* 24 (11) 2012.
65. Correa H. Rojas H. Ceron J. Pabon M. Carulla J. 2011. MUN: herramienta para mejorar el contenido de proteína en la leche. VII seminario Competitividad en carne y leche, Cooperativa Colanta.
 66. Cowan JA. 1993. Metallobiochemistry of RNA. $\text{Co}(\text{NH}_3)_3^{3+}$ as a probe for $\text{Mg}^{2+}(\text{aq})$ binding sites. *J Inorg Biochem* 49, 171–175.
 67. Cowan JA. 1998 Metal activation of enzymes in nucleic acid biochemistry. *Chem Rev* 98, 1067–1087.
 68. Cruz R, Hernández, Calva L, Guerrero M, Pérez C, Ramírez, Bribiesca E. 2002. Fisiología Digestiva En Corderos Alimentados Con Dietas Altas En Energía Y Dos Concentraciones De Selenio Y Magnesio; En XXIX Congreso nacional de Buiatria- Mexico.
 69. Cuervo W. Orrego C. Correa H.J. 2011. Determinación de la actividad in situ de gama glutamil transferasa (GGT) bajo el efecto de infusión ruminal de magnesio. 2011. *Revista Colombiana Ciencias Pecuarias* 2011; 24:3
 70. Czerkawski J and Breckenridge G. 1977. Design and development of a long-term rumen simulation technique (Rusitec) *Br. J. Nutr.* (1977). 38, 371
 71. Daryl K, Granner M. 2003 The Diversity of the Endocrine System. In *Harper's Illustrated Biochemistry*. Cap 42 p441
 72. Dalley, D. E., P. Isherwood, A. R. Sykes, and A. B. Robson. 1997. Effect of intraruminal infusion of potassium on the site of magnesium absorption within the digestive tract in sheep. *J. Agric. Sci.* 129:99–105
 73. De Baat W.C. 1926. *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas*, Vol 45, pp 237
 74. Dehority B. Orpin C. 1997. Development of and natural fluctuations in, rumen microbial populations. *The Rumen Microbial Ecosystem*. 1997, pp 196-245
 75. Ding Y. Zhang G. Wu H. Hai B. Wang L. Qian Y. 2001. Nanoscale Magnesium Hydroxide and Magnesium Oxide Powders: Control over Size, Shape, and Structure via Hydrothermal Synthesis. January 12, 2001 Copyright © 2001 American Chemical Society
 76. Douglas G, Overton T, Bateman H, Dan H, Drackley J. 2006. Prepartal Plane of Nutrition, Regardless of Dietary Energy Source, Affects Periparturient Metabolism and Dry Matter Intake in Holstein Cows. *J. Dairy Sci.* 89:2141–2157
 77. Drackley, J. K., H. M. Dann, G. N. Douglas, N. A. Janovick Guretzky, N. B. Litherland, J. P. Underwood, and J. J. Loo. 2005. Physiological and pathological adaptations in dairy cows that may increase susceptibility to periparturient diseases and disorders. *Ital. J. Anim. Sci.* 4:323-344.
 78. Dua, K. and Care, A.D. 1995. Impaired absorption of magnesium in the aetiology of grass tetany. *British Veterinary Journal* 151, 413–426.

79. Duque M. 2013. Efecto de la suplementación con ácidos grasos protegidos ricos en n-3 y n-6 sobre los parámetros productivos, reproductivos y balance energético en vacas holstein. Contenido en línea: < <http://hdl.handle.net/10495/1637>>
80. Ebel, H. and Günther, T. 1980. Magnesium metabolism: a review. *Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry* 18, 257–270.
81. El-Shazly, K., B. A. Dehority, and R. R. Johnson. 1961. Effect of starch on the digestion of cellulose in vitro and in vivo by rumen microorganisms. *J. Anita. Sci.* 20:268.
82. Emanuele S M, Staples C R and Wilcox C J 1991 Extent and site of mineral release from six forage species incubated in mobile dacron bags. *Journal of Animal Science.* 69: 801. <http://jas.fass.org/cgi/reprint/69/2/801>
83. Emery S. Brown L. Bell J. 1965. Correlation of Milk Fat with Dietary and Metabolic Factors in Cows Fed Restricted-Roughage Rations Supplemented with Magnesium Oxide or Sodium Bicarbonate. *Journal of Dairy Science*, Volume 48, Issue 12, December 1965, Pages 1647–1651.
84. Erdman R. A 1988. Dietary Buffering Requirements of the Lactating Dairy Cow: A Review. 1988 *J Dairy Sci* 71 : 3246—3266.
85. Erdman R.A Hemken R.W. Bull L.S. 1982. Dietary Sodium Bicarbonate and Magnesium Oxide for Early Postpartum Lactating Dairy Cows: Effects on Production, Acid-Base Metabolism, and Digestion. 1982 *J Dairy Sci* 65:712-731
86. Erdman, R. A., R. L. Botts, R. W. Hemken, and L. S. Bull. 1980. Effect of dietary sodium bicarbonate and magnesium oxide on production and physiology in early lactation. *J. Dairy Sci.* 63:923– 930.
87. Espinoza J. McDowell R. Wilkinson N. Conrad J. Martin F. 1991. Forage and soil mineral concentrations over a three-year period in a warm climate region of central Florida. I. Macrominerals. *Livestock Research for Rural Development*. Volume 3, Number 1, March 1991
88. Faixová Z, Faix F. 2002. Influence of metal ions on ruminal enzyme activities *Acta vet. Brno* 2002, 71: 451–455
89. Faixová zita, faix, maková, váczi, prosbová. 2006. Effect of divalent ions on ruminal enzyme activities in sheep. *Acta veterinaria (beograd)*, V56(1), 17-23,
90. Faverdin, P., B. Richou, and J.-L. Peyraud. 1992. Effects of digestive infusions of volatile fatty acids or glucose on food intake in lactating or dry cows. *Ann. Zootech. (Paris)* 41:93.
91. FEDNA. Fundacion española para el desarrollo de la nutricion animal. Informacion en línea: <http://www1.etsia.upm.es/fedna/tablas.htm#subc>
92. Fernando, H. T. Purvis F. Z. Najar L. O. Sukharnikov C. R. Krehbiel. T. G. Nagaraja, B. A. Roe and U. DeSilva. 2010. Rumen Microbial

- Population Dynamics during Adaptation to a High-Grain Diet. *Applied And Environmental Microbiology*, Nov. 2010, p. 7482–7490 Vol. 76, No. 22.
93. Field, A.C. and Munro, C.S.M. 1977. The effect of site and quantity on the extent of absorption of Mg infused into the gastro-intestinal tract of sheep. *Journal of Agricultural Science, Cambridge* 89, 365–371.
 94. Fiems, L. O., B. G. Cottyn, Ch. V. Boucque, J. M. Vanacker, and S. De Campeneere. 1999a. Effect of different degraded protein balances (OEB) on the performance of beef bulls and on digestibility and rumen fermentation in sheep. *Neth. J. Agric. Sci.* 47:17–28.
 95. Findeisen, R. 1972. Untersuchungen fiber Aktivitiit der α -Glutamyl-transpeptidase im Serum gesunder und kranker Rinder. Inaug. Diss. Med. Vet. Hanhover.
 96. Fishwick, G. 1978. Utilisation of the phosphorus and magnesium in some calcium and magnesium phosphates by growing sheep. *New Zealand Journal of Agricultural Research* 21, 571–575.
 97. Fontenot J. Wise M. Webb K. 1973. Inter-relationships of potassium, nitrogen and magnesium in ruminants. 1973. *Fed. Proc.* 32: 1925 – 1928.
 98. Forsberg CW, Lam K. 1977. Use of the adenosine 5'-triphosphate as an indicator of the microbiota biomass in rumen contents. *Appl Environ Microb* 33:528-537.
 99. Fraga M, Perelmuter K, Valencia M J, Cajarville C, Zunino P. 2012. Caracterización de la microbiota bacteriana ruminal de un bovino a pastoreo mediante técnicas clásicas e independientes del cultivo. *VETERINARIA (Montevideo)* - Vol. 49 - # 189 - Año 2013 - P. 40 a 55
 100. Franzolin R. Dehority B. 2010. The role of pH on the survival of rumen protozoa in steers. *R. Bras. Zootec.* V39 N10. P 2262.
 101. Furchtenicht J.E., Broderick G.A. 1987. Effect of inoculum preparation and dietary energy on microbial numbers and rumen protein degradation activity. *Journal. of Dairy Science*, 70, 1404–1410.
 102. Gaál K, Sáfár O, Gulyás L, Stadler P. 2004. Magnesium in Animal. *Journal of the American College of Nutrition*, Vol. 23, No. 6, 754S–757S (2004). *Nutrition* <http://www.jacn.org/content/23/6/754S.full.pdf>
 103. Galbraith, H., Miller, T. B., Paton, A. M. and Thompson, J. K. 1971. Antibacterial Activity of Long Chain Fatty Acids and the Reversal with Calcium, Magnesium, Ergocalciferol and Cholesterol. *Journal of Applied Microbiology*, 34: 803–813. doi: 10.1111/j.1365-2672.1971.tb01019.x
 104. Galindo J. Gonzalez N. Aldama A. Marrero Y. 2001. Efecto de *Enterolobium cyclocarpum* en la población microbiana ruminal y su actividad en condiciones in vitro. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, Tomo 35, No. 3, 2001. 241.

105. GANASAL Colombia ®. Producto comercial: Sal mineralizada para ganado lechero colombiano. contenido en línea: <http://www.ganasal.com/productos/ganasal-leche/>.
106. Garcia A. 2009. Alimentación preventiva de la vaca en transición. Extension Extra. South Dakota University. Contenido en línea: <http://agbiopubs.sdstate.edu/articles/ExEx4041S.pdf>.
107. García, A. & Kalscheur, K. 2006. Tamaño de particular y Fibra efectiva en la dieta de las vacas lecheras College of Agriculture and Biological Sciences. South Dakota State University. USA. p 5. Disponible: <<http://agbiopubs.sdstate.edu/articles/ExEx4033S.pdf>>.
108. Garcia-Gomez, F. Williams P. Aumaitre A. Lee, Bd, Ha, Jk 2000. Magnesium metabolism in ruminant animals and its relationship to other inorganic elements. Proceedings of the 2000 International Symposium: Recent Advances in Animal Nutrition, Seoul, Korea, 20-22 April 2000. Asian-Austr J Anim Sci 13: 158-170
109. García-sanmartín J. García-perez A. Barandika J. Adúriz G. Ziluaga I. Juste R. Berriatua, E. 2001. Actividad sérica de gamma-glutamilttransferasa (GGT) y aspartato aminotransferasa (AST-GOT) en ovejas del país vasco. Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario (NEIKER), 48160 - Derio. Bizkaia.
110. Gentry, R.P., Miller, W.J. and Pugh, D.G. 1978. Effects of feeding high magnesium to young dairy calves. Journal of Dairy Science 61, 1750.
111. Giduck S. Fontenot J and Rahnema S. 1988. Effect of Ruminant Infusion of Glucose, Volatile Fatty Acids and Hydrochloric Acid on Mineral Metabolism in Sheep. J Anim Sci 1988. 66:532-542
112. Giraldo L.A. Gutierrez L. Rua C.2007. Comparación de dos técnicas in vitro e in situ para estimar la digestibilidad verdadera en varios forrajes tropicales. Rev Col Cienc Pec 2007; 20:269-279
113. Giri S. Jaggi S. Pathak N. 2005. Feeding of grainless diets containing different nitrogen sources to crossbred growing bulls: effects on rumen fermentation pattern, microbial enzyme activity and ciliate protozoa population. Animal Feed Science and Technology. 118 (2005) 187–200
114. Goering HK and VanSoest PJ. 1970. Forage Fiber Analyses (Apparatus, Reagents, Procedures, and Some Applications). USDA Agricultural Research Service. Agricultural Handbook No. 379
115. Goering, H. K. and P.J. Van Soest. 1970. Forage Fiber Analysis (apparatus, reagents, procedures and some applications). USDA Agricultural Handbook No. 379.
116. Goff J. 2006. Macromineral physiology and application to the feeding of the dairy cow for prevention of milk fever and other periparturient mineral disorders. Animal Feed Science and Technology 126 (2006) 237–257

117. Gojon H, Siqueiros D, Contreras H. 1998. Digestibilidad ruminal y degradabilidad in situ de *macrocystis pyrifera* y *sargassum* spp. en ganado bovino. *Ciencias Marinas*, vol. 24, núm. 4, diciembre, 1998, pp. 463-481, Universidad Autónoma de Baja California México
118. Greene, L. W., Fontenot, J.P. and Webb Jr., K.E. 1983. Site of magnesium and other macromineral absorption in steers fed high levels of potassium. *J. Anim. Sci.* 57:503
119. Gring E. Males J. 1988. Performance, blood and ruminal characteristics of cows receiving monensina and magnesium supplement. *J. Animal Science* 66:566.
120. Grubb J. y Dehority B. 1975. Effects of an Abrupt Change in Ration from All Roughage to High Concentrate upon Rumen Microbial Numbers in Sheep. *Appl. Microbiol.* 1975, 30(3):404.
121. Grudsky R. Arias J. 1995. Aspectos generales de la microbiología del rumen. Monografía de pregrado. Universidad de Chile. http://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/manejo_del_alimento/12-microbiologia.pdf
122. Ha, J. K., and J. J. Kennelly. 1984. Influence of freeze storage on nucleic acid concentrations in bacterial and duodenal digesta. *Can. J. Anim. Sci.* 64:791.
123. Hall M. Huntington G. 2008. Nutrient synchrony: Sound in theory, elusive in practice. *J Anim Sci* April 2008 vol. 86 no. 14 suppl E287-E292.
124. Harris, B., Jr., H. H. Van Horn, K. E. Manookian, S. P. Marshall, M. J. Taylor, and C. J. Wilcox. 1983. Sugar-cane silage, sodium hydroxide and steam pressure-treated sugarcane bagasse, corn silage, cotton seed hulls, sodium bicarbonate and *aspergillus oryzae* product in complete rations for lactating cows. *J. Dairy Sci.* 66:1474.
125. Hashimoto W, Suzuki H, Yamamoto K, Kumagai H. 1997. Analysis of low temperature inducible mechanism of gamma-glutamyltranspeptidase of *Escherichia coli* K-12. *Biosci Biotechnol Biochem.* 1997 Jan;61(1):34-9.
126. Henry, P.R. and Benz, S.A. 1995. Magnesium bioavailability. In: Ammerman, C.B., Baker, D.H. and Lewis, A.J. (eds) *Bioavailability of Nutrients for Animals*. Academic Press, New York, pp. 239–256.
127. Hobson PN and Stewart C S. 1997. *The Rumen Microbial Ecosystem*, Blackie Academic & Professional, London.
128. Hofmeister F. 1880. *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.* 24, (1888) 247-260.
129. Hogue J. Tucker W. Van koevering T. Vernon K and Adams G. 1991. Controlled Ruminant Infusion of Sodium Bicarbonate. 1. Influence of Postfeeding Infusion Interval on Ruminant Milieu. <http://www.exopol.com/seoc/docs/0g1m78f4.pdf>

130. Holden, L. A., L. D. Muller, and S. L. Fales. 1994. Estimation of intake in high producing Holstein cows grazing grass pasture. *J. Dairy Sci.* 77:2332–2340.
131. Holdridge L. 1996. *Ecología basada en zonas de vida*. San José de Costa Rica: Instituto interamericano de cooperación para la agricultura.
132. Horn J. Smith R. 1978. Absorption of magnesium by young steer. *Br. J. Nutr.* 40:473-484. 1978. <http://www.cipav.org.co/lrrd/lrrd18/2/corr18031.htm>.
133. Hristov A.N., McAllister T.A., Xu Z., Newbold J.C. 2002. Proteolytic activity in ruminal fluid from cattle fed two levels of barley grain: a comparison of three methods of determination. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82, 1886–1893.
134. Hsu J, Fahey G 1990. Effects of Centrifugation Speed and Freezing on Composition of Ruminal Bacterial Samples Collected from Defaunated Sheep Original Research Article. *Journal of Dairy Science*, Volume 73, Issue 1, January 1990, Pages 149-152
135. Huntington, G. B. 1986. Uptake and transport of nonprotein nitrogen by the ruminant gut. 1986. *Fed. Proc.* 45: 2272-2276.
136. Hurley W 2006. Lactation biology Website. Department of Animal Sciences University of Illinois, Urbana, IL
137. Hutjens M. 1991. *Feed Additives: Which, When, and Why*. livestocktrail.illinois.edu
138. IFFC 1983. methods for the measurement if catalytic concentration of enzymes. Part 4. IFCC method for γ -glutamyltransferase. *J Clin Chem Biochem* 1983;21:633-646.
139. Ikeda Y. Taniguchi N. 2005. gamma-Glutamyl transpeptidase: catalytic mechanism and gene expression. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 1998; 72: 239–78.
140. J. B. Whitfield. 2001. Gamma Glutamyl Transferase. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 38(4):263–355 (2001) 1040-8363/01/\$.50
141. Jesse, B. W., J. W. Thomas, and R. S. Emery. 1981. Availability of magnesium from magnesium oxide particles of differing sizes and surfaces. *J. Dairy Sci.* 64:197.
142. Jittakhot S. Schonewille J. Wouterse H. Yuangklang C, and Beynen C. 2004. Apparent Magnesium Absorption in Dry Cows Fed at 3 Levels of Potassium and 2BY. *J. Nutr.* (1967), 21, 819 819
143. John, A., and M. 1. Ulyatt. 1984. Measurement of protozoa, using phosphatidyl choline, and of bacteria, using nucleic acids, in the duodenal digesta of sheep fed chaffed lucerne hay (*Medicago Saliva L.*) diets. *J. Agric. Sci. (Camb.)* 102:33.
144. Johnson R. 1966. Techniques and Procedures for In Vitro and In Vivo Rumen studies. *J ANIM SCI* 1966, 25:855-875.

145. Johnson, C.L., Helliwells, S.H. and Aubrey Jones, D.A. 1988. Magnesium metabolism in the rumens of lactating dairy cows fed on spring grass. *Quarterly Journal of Experimental Physiology* 73, 23–31.
146. Kehres D and Maguire M. 2002. Structure, properties and regulation of magnesium transport proteins. *BioMetals* 15: 261–270, 2002
147. Keillor. J. Castonguay R. Lherbet C. 2005. Gamma glutamyl transferase. *Meth. Enzymol.* 401. 2005. 449–467.
148. Kemp, A. and Todd, J.R. 1970. Prevention of hypomagnesaemia in cows: the use of magnesium alloy bullets. *Veterinary Record* 86, 463–464
149. Klusmeyer, T. H., and J. H. Clark. 1991. Effects of dietary fat and protein on fatty acid flow to the duodenum and in milk produced by dairy cows. *J. Dairy Sci.* 74:3055
150. Knowless M. 2012. Efecto de la fuente y el nivel de almidón en la dieta de vacas holstein lactantes sobre la producción y el contenido de proteína en la leche. Tesis de Maestría. Biblioteca digital Universidad nacional de Colombia. Contenido en línea <http://www.bdigital.unal.edu.co/8708/1/780206.2012.pdf>.
151. Kohn R. A., Dinneen M. M. and Russek-Cohen E. 2005. Using blood urea nitrogen to predict nitrogen excretion and efficiency of nitrogen utilization in cattle, sheep, goats, horses, pigs, and rats. *J. Anim. Sci.* 83:879–889
152. Kopečný J. Wallace J. 1982. Cellular Location and Some Properties of Proteolytic Enzymes of Rumen Bacteria. *Applied And Environmental Microbiology*, May 1982, Vol 43 No 5. p. 1026-1033
153. Kramer S y Hoffmann L. 1997. In *Clinical biochemistry of domestic animal*, 5th ed. San Diego. Academic Press Inc. 1997. 780p.
154. Kristensen N. Storm A and Larsen M. 2010. Effect of dietary nitrogen content and intravenous urea infusion on ruminal and portal-drained visceral extraction of arterial urea in lactating Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 93 :2670–2683
155. Krysl LJ, Judkins MB, Bohman VR. 1991. Influence of ruminal or duodenal soybean oil infusion on intake, ruminal fermentation, site and extent of digestion, and microbial protein synthesis in beef heifers consuming grass hay. *J Anim Sci.* 1991 Jun;69(6):2585-90.
156. Krysl LJ, Judkins MB, Bohman VR. 1991. Influence of ruminal or duodenal soybean oil infusion on intake, ruminal fermentation, site and extent of digestion, and microbial protein synthesis in beef heifers consuming grass hay. *J Anim Sci.* 1991 Jun;69(6):2585-90.
157. Kurihara Y. Eadie J. Hobson P. Mann S. 1968. Relationship between bacteria and ciliate protozoa in the rumen sheep. *J. Gen. Microbiol.* (1968) 51, 267 – 288.

158. Kurihara Y, Eadie J, Hobson P, Mann S. 1968. Relationship between bacteria and ciliate protozoa in the rumen sheep. *J. Gen. Microbiol.* (1968) 51, 267 – 288.
159. Laporte JA, AR Sykes. 2004. Intestinal magnesium absorption in ruminant compensate by reduction in ruminal absorption. XI Congress International Society of Animal Clinical Biochemistry, Valdivia, Chile, Pp 47
160. Lee, S.R. and Britton, W.M. (1987) Magnesium-induced catharsis in chicks. *Journal of Nutrition* 117, 1907–1912.
161. Lemosquet. S., N. Rideau, H. Rulquin, P. Faverdin, and J. Simon. 1997. Effect of a duodenal glucose infusion on the relationship between plasma concentrations of glucose and insulin in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 80:2854–2865.
162. Lemosquet. S., N. Rideau, H. Rulquin, P. Faverdin, and J. Simon. 1997. Effect of a duodenal glucose infusion on the relationship between plasma concentrations of glucose and insulin in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 80:2854–2865.
163. Lidberg J. 1984. Nitrogen metabolism in sheep. 2. A comparison between rumen degradability of nitrogen an organic matter in sacco and in vivo in sheep fed rations and various protein supplements. *Swedish journal of agricultural research.* 14:37
164. Lindberg, J. E., and P. G. Knutsson. 1981. Effect of bag pore size on the loss of particulate matter and on the degradation of cell wall fibre. *Agric. Environ.* 6: 171.
165. Littledike, E., J. Stuedeman, S. Wilkinson, and R. Horst. 1983. Grass tetany syndrome. Pages 173–195 in *Role of Magenesium in Animal Nutrition.* J. Fontenot, G. Bunce, K. Webb, and V. Allen, eds. John Lee Pratt Annual Nutrition program. Blacksburg, VA.
166. Lough D, Beede D, Wilcox C. 1990. Lactational Responses to and In Vitro Ruminal Solubility of Magnesium Oxide or Magnesium Chelate. *Journal of Dairy Science*, Volume 73, Issue 2, February 1990, Pages 413–424
167. Luchini N, Broderick and. Combs D. 1996. Preservation of ruminal microorganisms for in vitro determination of ruminal protein. 1996. *J ANIM SCI* 1996, 74:1134-1143
168. Mader, T.L., Teeter, R.G. and Horn, G.W. 1984. Comparison of forage labeling techniques for conducting passage rate studies. *Journal of Animal Science* 58, 208–212.
169. Madsen, J. and Hvelplund, T. 1994. Prediction of in situ protein degradability in the rumen: results of a European ringtest. *Livestock Production Science* 39, 201–212.
170. MAFF 1992. Feed composition – UK Tables of Feed Composition and Nutritive Value for Ruminants,

171. Malik K. 1988. A new freeze-drying method for the preservation of nitrogen-fixing and other fragile bacteria *Journal of Microbiological Methods*, Volume 8, Issue 5, September 1988, Pages 259–271.
172. Malik K. 1991. Cryopreservation of bacteria with special reference to anaerobes. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* November 1991, Volume 7, Issue 6, pp 629-632.
173. Marschner H. 1990. Functions of mineral nutrients: macronutrients; In: *Mineral nutrition of higher plants*. Academic Press, San Diego, CA. Chapter 8: 195 – 267
174. Martens H, M Schweigel. 2000. Pathophysiology of grass tetany and other hypomagnesemias. Implications for clinical management. *Vet Clin N Am (Food Anim Pract)* 16, 339-368.
175. Martens H. Harmeyer J. Breves G. 1973. In vitro studies on magnesium uptake by rumen epithelium using ²⁸magnesium nuclear techniques in animal production and health, Viena, 261-266, 1963.
176. Martens H. Harmeyer J. Michael H. 1978. Magnesium transport by isolated rumen epithelium of sheep. *Res.Vet. Sci.* 24:261-268.1978.
177. Martens, H. and Blume, I. 1986. Effect of intraruminal sodium and potassium concentrations and of the transmural potential difference on magnesium absorption from the temporarily isolated rumen of sheep. *Quarterly Journal of Experimental Physiology* 71, 409–415.
178. Martens, H. and Blume, I. 1986. Effect of intraruminal sodium and potassium concentrations and of the transmural potential difference on magnesium absorption from the temporarily isolated rumen of sheep. *Quarterly Journal of Experimental Physiology* 71, 409–415
179. Martens, H., Kubel, O.W., Gabel, G. and Honig, H. 1987. Effects of low sodium intake on magnesium metabolism of sheep. *Journal of Agricultural Science, Cambridge* 108, 237–243.
180. Martens, H., Schweigel, M., 2000. Pathophysiology of grass tetany and other hypomagnesemias. Implications for clinical management. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 16, 339–368.
181. Martin MN, Slovin JP. 2000. Purified gamma-glutamyl transpeptidases from tomato exhibit high affinity for glutathione and glutathione S-conjugates. *Plant Physiol* 2000; 122: 1417–26.
182. Masuyama R, Uehara M, Suzuki K, Goto S. 1995. The action of magnesium in reducing renal calcification in rats receiving high phosphorus supplemented diet *Nutrition Research*, Volume 15, Issue 11, November 1995, Pages 1673-1682.
183. Mayo M. Sanchez M. Hernandez F. Rivas M. 2000. Evaluación de diferentes metodos de conservación del líquido ruminal para pruebas in vitro.2000. *Nutrición y alimentación xxv: comunicación* 9
184. McDonald P, Edwards RA, Greenhalgh J. 1971. “*Animal Nutrition*,” 3rd ed. London: Oliver and Boyd, pp 83–84, 1971.

185. McDowell L.R. 1996. Feeding minerals to cattle on pasture, *Animal Feed Science Technology* 60 (1996) 247-27 1
186. McDowell, L.R., 1985. *Nutrition of Grazing Ruminants in Warm Climates*. Academic Press, New York.
187. Mehrez A Z & Ørskov E R 1977. A study of the artificial fibre bag technique for determining the digestibility of feeds in the rumen *Journal of Agricultural Science Cambridge* 88:645-650
188. Meissonnier, E., and P. Rousseau, 1976. Les tests enzymatiques clans l'exploration fonctionnelle du foie chez les bovins. Page 633 in *Reports and abstracts of the 9th international congress on diseases of cattle*. Meissonnier, E., ed. ITCF, 91720, Maise, France
189. Meister A. Tate S. Ross. 1976. Membrane-Bound γ -Glutamyl Transpeptidase. *The enzymes of biological membranes*. Plenum Press. New York. 1976
190. Merry, R. J., and A. B. McAllan. 1983. A comparison of the chemical composition of mixed bacteria harvested from the liquid and solid fraction of rumen digesta. *Br. J. Nutr.* 50:701.
191. Mertens, D. R., and J. R. Loften. 1980. The effects of starch on forage fiber digestion kinetics in vitro. *J. Dairy Sci.* 63:1437
192. Metson J. 1978. Seasonal variations in chemical composition of pasture II. Nitrogen, sulphur, and soluble carbohydrate. *New Zealand Journal of Agricultural Research*. Volume 21, Issue 2, 1978.
193. Milieu J. Hogue W. Tucker B. Van koeving T. Vernon K and Adams G. 1991. Controlled Ruminal Infusion of Sodium Bicarbonate. 1. Influence of Postfeeding Infusion Interval on Ruminal
194. Minson, D.J. 1990. Magnesium. In: *Forage in Ruminant Nutrition*. Academic Press, Sydney, pp. 265–290.
195. Miron J, Ben-Ghedalia D, Morrison M. 2001. Invited Review: Adhesion mechanisms of rumen cellulolytic bacteria. *J Dairy Sci* 84:1294-1309
196. Miyazaki, S.1991. Effect of chemicals o glutathione peroxidase of chick liver. *Research in Veterinary Sc.* 51: 120-122.
197. Moharrery A, Tirta K. 2001. Correlation between microbial enzyme activities in the rumen fluid of sheep under different treatments. 2001. *Reprod. Nutr. Dev.* 41 (2001) 513–529
198. Mojica J. Castro E. León J. Cárdenas E. Pabón M. Carulla J. 2009. Efecto de la oferta de pasto kikuyo (*Pennisetum clandestinum*) sobre la producción y calidad composicional de la leche bovina. *Livestock Research for Rural Development* 21 (01) 2009
199. Monsalve F. 2004. Comparación de dos métodos para estimar la digestibilidad posruminal de la proteína cruda del pasto kikuyo (*Pennisetum clandestinum*). Trabajo de grado de Zootecnia, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia, Medellín. 18 p.

200. Morgan S. 2011. Solubility Rules En: Analytical Chemistry. University of South Carolina. Contenido en línea: <http://www.chem.sc.edu/faculty/morgan/resources/solubility/>
201. Morrison, M., Murray, R.M. and Boniface, A.N. 1990. Nutrient metabolism and rumen microorganisms in sheep fed a poor quality tropical grass hay supplemented with sulphate. *Journal of Agricultural Science* 115, 269–275.
202. Moseley G y Griffiths D. 1984. The mineral metabolism of sheep fed high and low magnesium selections of Italian ryegrass. *Grass Forages science*, 39:105.
203. Mould, F.L. & Ørskov, E.R., 1984. Manipulation of rumen fluid pH and its influence on cellulolysis in sacco, dry matter degradation and the rumen micro flora of sheep offered either hay or concentrate. *Anim. Feed Sci. Technol.* 10, 1-14
204. Mouriño F. Akkarawongsa R. and Weimer P. 2001. Initial pH as a Determinant of Cellulose Digestion Rate by Mixed Ruminant Microorganisms In Vitro. *J. Dairy Sci.* 84:848–859.
205. Nakayama R. Kumagai H. Tochikura T. 1984. γ -Glutamyltranspeptidase from *Proteus mirabilis*: Localization and Activation by Phospholipids. *Journal Of Bacteriology*, Dec. 1984, p. 1031-1036 Vol. 160, No. 3
206. National Library of Medicine - Medical Subject Headings 2006
207. Neathery M W 1972. Conventional digestion trials vs nylon bag technique for determining seasonal difference in quality of midland Bermuda grass *Journal of Animal Science* 34: 1075-1084.
208. Nelson D, Cox M. 2001. *Lehninger Principles of Biochemistry*. cap 18;657-659.
209. NIST 2011. National Institute of standards and technology. Standard reference database 2011
210. Nocek J E 1988 In situ and other methods to estimate ruminal protein and energy digestibility: a review. *Journal of Dairy Science* 71 (8): 2051 – 2069
211. Nocek, J. E. 1985. Evaluation of specific variables affecting in situ estimates of ruminal dry matter and protein digestion. *J. Anim. Sci.* 60:1347.
212. Noda, C., Nakamura, T., and Ichihara, A. 1983. α -adrenergic regulation of enzymes of amino acid metabolism in primary cultures of adult rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 258, 1520-1525
213. NRC. National Research Council 2001 Nutrients requeriments of dairy cattle; Seven Revised edition, Cap 9, 12, 15, 1.
214. O'Kelley, R. E., and J. P. Fontenot. 1969. Effects of feeding different magnesium levels o drylot-fed lactating beef cows. *J. Anim. Sci.* 29:994– 1000.

215. Ogawa, H., Fujioka, M., Su, Y., Kanamoto, R., and Pitot. H.C. 1991. Nutritional regulation and tissue-specific expression of the serine dehydratase gene in rat. *J. Biol. Chem.* 266, 20412-20417
216. Ørskov ER, Hovell FD DeB and Mould F. 1980. The use of nylon bag technique for the evaluation of feedstuffs. *Tropical Animal Productivity* 195-213.
217. Ørskov F and McDonald 1979. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. *Journal of Agricultural Science, Cambridge* 92: 499-503
218. Ortega M. Carranco M. 1993. Factores que afectan la digestibilidad in situ de 10s alimentos en el rumen. *Vet Mex.* 24 (1) 1993.
219. Osuji G 1981. The disintegration of yam tuber gamma-glutamyl transpeptidase during tuber storage. *Acta Biol Med Ger* 1981; 40: 1497–501.
220. Owen F. y Goetsch A. 1989. Fermentación Ruminal. Cap 8 EN *El Rumiante Fisiología Digestiva y Nutricion de Church D.* 1989. Ed Acribia.
221. Owens F. Zinn R. 1989. Metabolismo de la Proteina en los Rumiantes EN *Church D El rumiante fisiología digestiva y nutrición.* 1989. Ed Acribia. Cap 12.
222. Pabón M. 2004. Notas de clase Bioquímica Ruminal. 2004. ISBN: 958-701-464-2.
223. Paladines O. Leal J. 1979. Manejo y productividad de las praqderas en los llanos orientales de colombia. En *producción de pastos en suelos acidos de los trópicos.* P 330 – 355.
224. Pan J. Suzuki T. Koike S. Ueda K. Kobayashi Y. 2003. Effects of urea infused into the rumen on liquid- and particle-associated fibrolytic enzyme activities in steers fed low quality grass hay. *Animal Feed Science and Technology.* 104 (2003) 13–27
225. Panella-Riera N, Velarde A, Dalmau A, E. Fàbrega, M. Font i Furnols, M. Gispert, J. Soler, J. Tibau, M.A. Oliver, M. Gil. 2009. *Livestock Science*, Volume 124, Issues 1–3, September 2009, Pages 277-287.
226. Pardo O. Carulla J. Hess H. 2008. Efecto de la relación proteína y energía sobre los niveles de amonio ruminal y nitrógeno ureico en sangre y leche, de vacas doble propósito del piedemonte llanero, Colombia. *Rev Colomb Cienc Pecu.* 2008; 21:387-397.
227. Parsi J, Godio L, Miazzo R, Maffioli R, Echevarria A, Provensal P. 2001. Valoración Nutritiva De Los Alimentos y Formulación De Dietas. *Curso de Producción Animal, FAV UNRC.* Informacion en línea: <http://www.produccion-animal.com.ar>
228. Patnaik, Pradyot 2003. *Handbook of Inorganic Chemicals.* New York: McGraw Hill.

229. Patterson J and Hespell R. 1985 Glutamine synthetase activity in the ruminal bacterium *Succinivibrio dextrinosolvens*. *Journal of Applied and Environmental Microbiology*. 50(4): 1014-1020
230. Payne M J, MacLeod M N & Dekker R F M. 1972. Digestion of the dry matter, nitrogen, phosphorus, sulphur, calcium and detergent fibre fractions of the seed and pods of *Stylosanthes humilis* contained in terylene bags in the bovine rumen *Journal of Science of Food and Agriculture* 23: (8) 925-932
231. Peña G, Añez B. Mario D. 2007. Respuesta de la cebolla (*Allium cepa* L.) a la aplicación de azufre, magnesio, cinc y boro en suelos alcalinos. *Revista Forestal Venezolana - Número 043 - Vol 002*.
232. Petersen G, Pedersen C, Lindemann M, Stein H. 2011. Relative bioavailability of phosphorus in inorganic phosphorus sources fed to growing pigs. doi: 10.2527/jas.2009-2161J ANIM SCI vol. 89 no. 2 460-466
233. Pino I. Correa H. Cinética de la liberación ruminal de Fuentes inorgánicas. Datos sin publicar.
234. Posada S. Noguera. R. 2005. Técnica in vitro de producción de gases: Una herramienta para la evaluación de alimentos para rumiantes. *2005 Livestock Research for Rural Development* 17 (4)
235. Posada S. Rosero R. Rodriguez N. Costa Cruz A. Gazzinelli Neves M. De Melo A. Valadares R. Fenati L. Cruz R. 2009. Determinación de requerimientos y eficiencia energética en ganado cebú. *Rev Colomb Cienc Pecu* 2009; 22:3
236. Powley, G., Care, A.D. and Johnson, C.L. 1977. Comparison of daily endogenous faecal magnesium excretion from sheep eating grass with high sodium or high potassium concentrations. *Research in Veterinary Science* 23, 43–46.
237. Quin, J.I., Watli van cler, J.G. and Mybiirgli, S. 1938. Studies on the alimentary tract of Merino sheep in South Africa. 4. Description of experimental technique. *Onderstepoort J. vet. Sn. Anim. Znd.*, 11: 341-360
238. Radostits O, Gay C, Blood D, Hinchcliff K. 2002 *Medicina veterinaria, tratado de las enfermedades del ganado bovino, Ovino, Caprino, Procino y Equino*. Cap 15.
239. Reference Tables for Physical Setting/Chemistry. 2011 Edition. Kentucky University. Contenido en línea: <http://www.kentchemistry.com/newRT.pdf>
240. Reid, R.L., Jung, G.A. and Gross, C.F., 1976. Grass tetany as a metabolic problem in the eastern United States. *Proc. Hill Lands Int. Symp.*, West Virginia University, Morgantown, WV, pp. 640-648.
241. Reis, R. B., and D. K. Combs. 2000. Effects of increasing levels of grain supplementation on rumen environment and lactation *Journal of Dairy Science* Vol. 84, No. 2, 2001 performance of dairy cows grazing grass-legume pasture. *J. Dairy Sci.* 83:2889–2899.

242. Relling A. Mattioli G. 2003. Fisiología digestiva y metabólica de los rumiantes. Actualización. Ohio State University, Facultad de ciencias veterinarias, universidad mar del plata.
243. Reynolds C. Maltby S. 1994. Regulation of Nutrient Partitioning by Visceral Tissues in Ruminants. American Institute of Nutrition. 0022-3166/94
244. Rico A.G. Braun J.P. Benard P. 1977. Blood and Tissue Distribution of Gamma Glutamyl Transferase in the Cow . J Dairy Sci 60:1283-1287
245. Rios J. 1974. Una nota sobre el consumo de sales minerales en bovinos de carne a pastoreo. Agronomía Tropical 24(3): 227-234. 1974.
246. Roche J, Petch S, Kay J. 2005. Manipulating the Dietary Cation-Anion Difference via Drenching to Early-Lactation Dairy Cows Grazing Pasture Journal of Dairy Science Volume 88, Issue 1, January 2005, Pages 264–276
247. Rodwell V 2003. Biosynthesis of the Nutritionally Nonessential Amino Acids In Harper's Biochemistry 26th Edition. Cap 28.
248. Rogers, J. A., and C. L. Davis. 1982. Effects of intraruminal infusions of mineral salts on volatile fatty acid production in steers fed high-grain and highroughage diets. J. Dairy Sci. 65:953.
249. Roldan A. Perdomo P. Sánchez H. Ramirez M. 2000. Tecnificación del sistema de producción ganadera de doble propósito en el trópico alto andino Colombiano: amamantamiento restringido. Livestock Research for Rural Development 12 (2) 2000
250. Rosales M. Laredo M. Cuesta A. Anzola H. Hernández L. 1989. Uso de árboles forrajeros para el control de protozoarios ruminales. Livestock Research for Rural Development Volume 1, Number 1, November 1989.
251. Rosales M. Laredo M. Cuesta A. Anzola H. Hernández L. 1989. Uso de árboles forrajeros para el control de protozoarios ruminales. Livestock Research for Rural Development Volume 1, Number 1, November 1989.
252. Rotger A. Ferret A. Calsamiglia S. Manteca X. 2006. Effects of nonstructural carbohydrates and protein sources on intake, apparent total tract digestibility, and ruminal metabolism in vivo and in vitro with high-concentrate beef cattle diets. J Anim Sci 2006, 84:1188-1196.
253. Royal Society of chemistry - Chemspider. Contenido en línea: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.22987.html>
254. Rubin A, Terasaki M, Sanui H. 1979. Major intracellular cations and growth control: Correspondence among magnesium content, protein synthesis, and the onset of DNA synthesis in BALB/c3T3 cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. vol. 76 no. 8 p 3917–3921.

255. Russell JB, DB Dombrowski. 1980. Effect of pH on the efficiency of growth by pure cultures of rumen bacteria in continuous culture. *Appl Envir Microbiol* 39, 604-610.
256. Sakai H, Sakabe N, Sasaki K. 1996. Preliminary description of the crystal structure of gamma-glutamyltranspeptidase from *E. coli* K-12. *J Biochem (Tokyo)* 1996; 120: 26–8.
257. Sanchez L, Corrales L. 2005. Congelación bacteriana: Factores que intervienen en el proceso Nova - publicación científica ISSN:1794-2470 Vol.3 No. 3 enero- junio de 2005:1-120
258. Saro C. Ranilla J. Tejido M and Carro M. 2012. Influence Of Forage Type On Ruminal Microbes And Bacterial Diversity In Sheep. *Animal Feed Science and Technology*
259. Saro C. Ranilla M. Tejido M and Carro M. 2012b. Post-prandial changes of fiber-degrading microbes in the rumen of sheep fed diets varying in type of forage as monitored by real-time pcr and arisa. *Animal Feed Science and Technology*
260. Scandolo D, Noro D. Bohmwald H. Contreras P. Wittwer. 2007. Variación diurna del pH y de las concentraciones de magnesio y potasio del fluido ruminal en vacas lecheras a pastoreo. *Arch. Med. Vet.* 39, Nº 2, 2007
261. Schaefer D. Wheeler L. Noller C. Keyser R. White J. 1982. Neutralization of Acid in the Rumen by Magnesium Oxide and Magnesium Carbonate. *Journal of Dairy Science* Vol. 65, No. 5, 1982
262. Schonewille J, H. Everts, Jittakhot S, y Beynen A 2007; Quantitative Prediction of Magnesium Absorption in Dairy Cows. *J. Dairy Sci.* 91:271–278
263. Schonewille J, Van't Klooster A, Wouterse H And Beynen A. 1998. Effects of Intrinsic Potassium in Artificially Dried Grass and Supplemental Potassium Bicarbonate on Apparent Magnesium Absorption in Dry Cows. *J Dairy Sci* 82:1824–1830
264. Schonewille, J. T. 1999. Magnesium absorption in ruminants. Ph.D. Thesis, Utrecht University, Utrecht, The Netherlands.
265. Schonewille J. 2013. Magnesium in dairy cow nutrition: an overview. *Plant and Soil* July 2013, Volume 368, Issue 1-2, pp 167-178
266. Scopes R.K. 1988. *Protein Purification*. Springer, New York, USA.
267. Scott, D. 1966. The effects of sodium depletion and potassium supplementation upon electrical potentials in the rumen of the sheep. *Quarterly Journal of Experimental Physiology* 51, 60–69.
268. Shils, M.E. 1997. Magnesium. In: O'Dell, B.L. and Sunde, R.A. (eds) *Handbook of Nutritionally Essential Mineral Elements*. Marcel Dekker, New York, pp. 117–152.
269. Shu Q. Liu A. 1995. Changes in Microbial Populations in the Rumen of Sheep after Overfeeding with Wheat. *Recent Advances in Animal Nutrition in Australia: July 1995*

270. Skoog D. West D. 2002. Introducción a la química analítica. Editorial Reverte. P. 27-29
271. Smith R. Maguire M. 1998. Microbial magnesium transport: unusual transporters searching for identity. *Molecular Microbiology* (1998) 28(2), 217–226
272. Smith, D.L., Tao, T., and Maguire, M.E. 1993. Membrane topology of a P-type ATPase: the MgtB Mg²⁺ transport protein of *Salmonella typhimurium*. *J Biol Chem* 268: 22469–22479.
273. SOMEX Colombia ®. Producto comercial: Calcileche 12%. Contenido en línea: http://www.somex.com.co/index.php?option=com_virtuemart&view=productdetails&virtuemart_product_id=53&virtuemart_category_id=237&Itemid=135
274. Soto C, Valencia A, Galvis R D y Correa H J 2005. Efecto de la edad de corte y del nivel de fertilización nitrogenada sobre el valor energético y proteico del pasto kikuyo (*Pennisetum clandestinum*). *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. Volume 18 (1): 17 - 26. Retrieved December 10, 2005, from http://rccp.udea.edu.co/v_anteriores/18-3/pdf/18-1-3.pdf.
275. Spears, J, Hatfield, E 1978. Nickel for ruminants. Influence of dietary nickel on ruminal urease activity. *J Anim Sci* 47: 1345-1350
276. Suga H, Cowan JA, Szostak JW. 1998. Unusual metal ion catalysis in an acyl-transferase ribozyme. *Biochemistry* 37, 10118–10125.
277. Suttle N. 1999. *The Mineral Nutrition of the livestock* 3rd Edition. Cap 1:14-17
278. Suttle N. and Field A. 1967 Studies on magnesium in ruminant nutrition," Effect of increased intakes of potassium and water on the metabolism of magnesium, phosphorus, sodium, potassium and calcium in sheep. *J. Dairy Sci.* 87:379–385
279. Suttle, N.F. 1987. The absorption, retention and function of minor nutrients. In: Hacker, J.B. and Ternouth, J.H. (eds) *The Nutrition of Herbivores*. Academic Press, Sydney, pp. 333–361.
280. Suzuki H. Kumagai H, Tochikura T. 1986. γ -Glutamyltranspeptidase from *Escherichia coli* K-12: Formation and Localization. *Journal Of Bacteriology*, Dec. 1986, p. 1332-1335.
281. Swain R. Nolan J. Klieve A. 1996. Natural Variability and Diurnal Fluctuations within the Bacteriophage Population of the Rumen. *Appl. Environ. Microbiol.* March 1996 vol. 62 no. 3 994-997
282. Tate S. Meister A. 1974. Interaction of γ -glutamyl transpeptidase with amino acids, dipeptides, and derivatives and analogs of glutathione. *J Biol Chem.* 1974; 249:7593–7602. [PubMed: 4154944]

283. Teeter, R.G., Owens, F.N. and Mader, T.L. 1984. Ytterbium chloride as a marker for particulate matter in the rumen. *Journal of Animal Science* 58, 465–473.
284. Terry, R. A., J.M.A. Tilley, and G. E. Outen. 1969. Effect of pH on cellulose digestion under in vitro conditions. *J. Sci. Food Agric.* 20:317.
285. Theodorou M. Williams B. Dhanoa M. McAllan A. France J. 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology*, Volume 48, Issues 3–4, August 1994, Pages 185–197
286. Thompson G. Meister A. 1974. Hydrolysis and transfer reactions catalyzed by gamma-glutamyl transpeptidase; evidence for separate substrate sites and for high affinity of L-cystine. *Biochem Biophys Res Commun.* 1976; 71:32–36. [PubMed: 9080]
287. Tilley J, Terry R. 1963. A two-stage technique for the in vitro digestion of forage crops. *J Br Grass Soc* 1963; 18:104-111.
288. Tohidi M, Ghasemi A, Hadaegh F, Arbabi S, Hosseini Isfahani F. 2011. Intra-erythrocyte magnesium is associated with gamma-glutamyl transferase in obese children and adolescents. *Biol Trace Elem Res.* 2011 Nov;143(2):835-43.
289. Tokoyama M. Johnson K. 1988. *Microbiologia del rumen e intestino EN El rumiantes, Fisiologia digestiva y Nutricion.* Church D. 1989 p137;189.
290. Tomas F and Potter B. 1976. The site of magnesium absorption from the ruminant stomach. *Br. Y. Nutr.* (1976), 36
291. Tsubota H. Hoshino S. 1969. Transaminase Activity in Sheep Rumen Content. *Journal of dairy science* col. 52, no. 12.
292. Uden P. Van Soest P. 1984. Investigation of the In situ bag technique and a comparison of the fermentation in heifers sheep, ponies and rabbits. *Journal of Animal Science* 58: 213
293. Underwood, E. Suttle N. 1999. *The mineral nutrition of livestock.* CAB International ISBN 0-5199-128-9
294. Valk H. Kogut J. 1998. Salt block consumption by high yielding dairy cows fed rations with different amounts of NaCl. *Livestock Production Science*, Volume 56, Issue 1, 1 October 1998, Pages 35–42. [http://dx.doi.org/10.1016/S0301-6226\(98\)00145-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0301-6226(98)00145-6).
295. Valkeners, D., A. The'wis, S. Amant, and Y. Beckers. 2006. Effect of various levels of imbalance between energy and nitrogen release in the rumen on microbial protein synthesis and nitrogen metabolism in growing double-muscled Belgian Blue bulls fed a corn silage-based diet. *J. Anim. Sci.* 84:877–885.

296. Van Eys, J. E. and R L. Reid. 1987. Ruminal solubility of nitrogen and minerals from fescue and fescued clover habage. *J. Anim. Sci.* 62:1101.
297. Van Hellen R. Ellis W. 1977. Sample container porosities for rumen in situ studies. *Journal of Animal Science* 44:141.
298. Van Lier E. Regueiro M. 2008. Digestión en retículo – rumen. Departamento de producción animal y de pasturas. Curso de Anatomía y Fisiología animal.
299. Van Soest P, Wine RH, Moore LA. 1966. Estimation of the true digestibility of forages by the in vitro digestion of cell walls. *Proc. 10th Int. Grasslands Congress. Helsinki. Finnish Grassland Association. 1966;* 438-441.
300. Van't Klooster A. 1967. De toestand van calcium, magnesium en enkele andere mineralen in darminhoud en mest van herkauwers in verband met hun resorptie. *Mededelingen Landbouwhogeschool, Utrecht University, Utrecht, The Netherlands.*
301. Vanhatalo, A. 1995. Assessment of intestinal feed nitrogen digestibility in ruminants by the mobile-bag method. *Dissertation, Agricultural Research Centre of Finland, Institute of Animal Production, 124 pp.*
302. Vargas J. 1993. Efecto de tres follajes arbóreos sobre el consumo voluntario y algunos parámetros de funcionamiento ruminal en ovejas africanas. *Livestock Research for Rural Development. Volume 5, Number 3, December 1993.*
303. Vargas J. Rodríguez O. Murgueitio E y Preston T. 1992. Efecto del nivel de oferta del cogollo de caña sobre el consumo y el ecosistema ruminal en ovejas africanas. *Livestock Research for Rural Development Volume 4, Number 1, July 1992*
304. Wacker, W. 1969. The biochemistry of magnesium. *Annals of the New York Academy of Sciences* 162, 717–726
305. Waldron M. Nishida T. Nonnecke B. Overton T. 2003. Effect of Lipopolysaccharide on Indices of Peripheral and Hepatic Metabolism in Lactating Cows. *Journal of Dairy Science* Vol. 86, Issue 11, Pages 3447-3459
306. Wallace, R. J., and C. A. McPherson. 1987. Factors affecting the rate of breakdown of bacterial protein in rumen fluid. *Br. J. Nutr.* 58:313.
307. Weimer P. Waghorn G. Odt L. Mertens D. 1998. Effect of Diet on Populations of Three Species of Ruminal Cellulolytic Bacteria in Lactating Dairy Cows. *1999 J Dairy Sci* 82:122–134
308. Weimer, P.J., 1996. Why don't ruminal bacteria digest cellulose faster? *J. Dairy Sci.* 79, 1496–1500
309. Whitfield J. 2001. Gamma Glutamyl Transferase. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 38(4):263–355 (2001).

310. Wilde D. 2006. Influence of macro and micro minerals in the periparturient period on fertility in dairy cattle. Alltech House UK <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2006.08.004>.
311. Willey, J. D. 2004. The effect of ionic strength on the solubility of an electrolyte', *Journal of Chemical Education* 81, 1644–1646.
312. Wilye M. Fontenont J. Greene W. 1985. Absorption of magnesium and other macrominerals in sheep infused with potassium in different parts of the digestive tract. *Journal of animal science*, Vol. 61, No. 5, 1985
313. Wittwer F. Contreras P. Klein R. Bohmwald T. 1995. Efecto de la administración oral de oxido de magnesio y sulfato de magnesio en vacas con hipomagnesemia inducida. *Arch. Med. Vet.* XXVII, Nº1, 1995.
314. Xin Z, Tucker W, Hemken R. 1989. Effect of Reactivity Rate and Particle Size of Magnesium Oxide on Magnesium Availability, Acid-Base Balance, Mineral Metabolism, and Milking Performance of Dairy Cows. 1989 *J Dairy Sci* 72:462-470
315. Xu K, Strauch MA. 1996. Identification, sequence, and expression of the gene encoding gammaglutamyltranspeptidase in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 1996; 178: 4319–22.
316. Zeigler D. Schlegel M. Edwards M. 2003. Development Of A Rumen Fluid Preservation Technique And Application To An In Vitro Dry Matter Digestibility Assay. 2003. Nutrition Advisory Group. California State Polytechnic University Pomona

CAPITULO 2

ESTIMACIÓN DE LA LIBERACIÓN RUMINAL DE CUATRO FUENTES INORGÁNICAS DE Mg POR MEDIO DE LA TÉCNICA *In situ*

Wilmer Cuervo ^a, Héctor Jairo Correa ^{ab}

^a Grupo de investigación en interacciones nutricionales, metabólicas y reproductivas en bovinos. ^b Departamento de Producción Animal, Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín,

Resumen

El Magnesio (Mg) es un mineral abundante en los forrajes utilizados en la alimentación de bovinos de leche, actuando como un cofactor en reacciones enzimáticas vitales para las principales vías metabólicas. Se ha establecido que la liberación ruminal del Mg contenido en forrajes de trópico alto es elevada (87%) pero se desconoce la liberación de este mineral trabajando con fuentes inorgánicas. Con el objetivo de evaluar la liberación ruminal de cuatro fuentes inorgánicas de magnesio (Mg) incubadas en forma de sal pura, se determinó la desaparición de la materia seca (DMS) del óxido de Mg (MgO), sulfato de Mg (MgSO₄), cloruro de Mg (MgCl₂) y carbonato de Mg (MgCO₃). Para ello se utilizaron 3 vacas Holstein canuladas al rumen (620 ± 14 Kg y 7 años en promedio) ubicadas en el municipio de Santa Elena Antioquia (2538 msnm; bH – MB; 16°C) consumiendo pasto kikuyo (*Cenchrus clandestinus* (Hoechst Ex Chiov) Morrone) a voluntad. Para la prueba se empacaron aproximadamente 0,5 g de cada fuente en bolsas de nailón con dos tamaños de poro (25 y 50µm) (por triplicado), se incubaron en el rumen de los tres animales y se evaluó la DMS en tres tiempos (0, 12 y 24h). Se utilizó un diseño en bloques completos al azar con un arreglo factorial 2x3x4 (dos tamaños de poro, tres tiempos de incubación y cuatro fuentes minerales) y una prueba de Tukey para establecer la significancia estadística de las diferencias entre promedios. Se detectó una interacción entre el tiempo de incubación y la fuente mineral sobre la DMS (p<0,0001).

No se observaron efectos del animal ($p=0,48$) pero sí del tamaño del poro ($p<0.01$). Se evidenciaron DMS superiores en los tres tiempos de incubación para el $MgCl_2$ y el $MgSO_4$ con respecto a las demás fuentes minerales ($p<0.0001$). La DMS para las bolsas con tamaño de poro de $25\mu m$ fue significativamente inferior a la observada en las bolsas de $50\mu m$ ($p<0,002$). La naturaleza higroscópica del $MgCl_2$ y el $MgSO_4$ pueden afectar la determinación inicial de la DMS. Las fuentes que tuvieron mayor DMS presentan a su vez la mayor solubilidad en agua. A pesar que todas las sales de Mg evaluadas mostraron un tamaño de partícula superior al de los tamaños de poro evaluados, la DMS fue independiente de este factor. De acuerdo a los resultados obtenidos en el experimento se puede afirmar que factores como el alto pH ruminal, la baja solubilidad en medio acuoso y las propiedades químicas de las fuentes inorgánicas afectan la DMS de dichos compuestos.

Palabras claves: Holstein, líquido ruminal, tamaño de poro, kikuyo, ANKOM, BRIONI.

Abstract

Magnesium (Mg) is an abundant mineral in forages used in dairy cattle feed, acting as a cofactor in enzymatic reactions vital for major metabolic pathways. It has been established that the ruminal release of Mg content in high tropical forages is high (87%) but the release of this mineral is known to work with inorganic sources. The aim of the study was to assess the ruminal release of four inorganics sources of magnesium (Mg) incubated as pure salt. The dry matter degradability (DMD) was measured for magnesium oxide (MgO), magnesium sulfate ($MgSO_4$), magnesium chloride ($MgCl_2$) and magnesium carbonate ($MgCO_3$). Three Holstein canulated cows (620 ± 14 Kg and seven years old) were housed in the paysandu ranch located in Santa Elena – Antioquia (2538 masl; bH – MB; $16^\circ c$). The animals were feed kikuyus grass (*Cenchrus clandestinus* (Hoechst Ex Chiov) Morrone) ad libitum. For the trial, 0,5 g of each Mg source was packed in nylon bags with two pore sizes (25 and $50\mu m$) (by triplicate). The bags were incubated in the rumen of the three cows and was assessed the DMD at 0, 12 and 24 hours. A Blocks completely

randomized design was used with a factorial arrangement 2x3x4 (two pore sizes three incubation times and four mineral springs) and a Tukey test for statistical significance of differences between means.

An interaction between time of incubation and the mineral resource on the DMS ($p < 0.0001$) was detected. No animal effect ($p = 0.48$) but pore size ($p < 0.01$) were observed. Were evident higher DMD in all three incubation times for the $MgCl_2$ and $MgSO_4$ respecting other mineral ($p < 0.0001$). The DMD for the bags with a pore size of $25\mu m$ was significantly lower than that observed in the bags of 50 microns ($p < 0.002$). The hygroscopic nature of $MgCl_2$ and $MgSO_4$ can affect the initial determination of the DMD. The sources had higher DMD have in turn increased water solubility. Although all tested Mg salts showed a higher particle size than the tested pore size, the DMD was independent of this factor. According to the results of the experiment can be said that factors such as high ruminal pH, low water solubility and the chemical properties of inorganic affect DMS sources of such compounds.

Keywords: *Holstein, ruminal Liquor, pore size, kikuyus, ANKOM, BRIONI.*

2.2. Introducción

El Magnesio (Mg) es un importante catión intracelular actuando como coenzima para reacciones enzimáticas vitales en las principales vías del metabolismo energético (NRC, 2001), su deficiencia es poco común en la mayoría de los animales domésticos (Aikawa, 1981, Underwood y Suttle, 1999). No obstante, cuando se ha observado bajas sensibles en el contenido de Mg en la dieta, se ha relacionado con el exceso de fósforo y potasio en la misma (Jittakhot et al 2004). Esta situación ha sido asociada con malformaciones en las extremidades e incluso mortalidades, particularmente en especies como la aviar y la porcina (Atteh y Leeson, 1983; 1986).

El bajo contenido de Mg (Tomas y Potter, 1976; Field y Munro, 1977) y el excesivo contenido de potasio en forrajes (Schonewille *et al.*, 1998; 2007) se ha

relacionado con altas incidencias de hipomagnesemia. Los forrajes tropicales presentan un contenido de Mg que oscila entre 0,36% para gramíneas y 0,28 % para leguminosas (Minson, 1990), mientras que los alimentos concentrados (energéticos y proteicos) presentan un mayor contenido de Mg que los forrajes (Adediji and Suttle, 1999). El bajo contenido de Mg en forrajes y en cereales (menos frecuente) ha sido identificada como la principal causa de hipomagnesemia (Tomas y Potter, 1976; Field y Munro, 1977) hecho agravado por el contenido excesivo de potasio (superior a 4,5% de la MS) en praderas altamente fertilizadas (Schonewille *et al* 2007). Este tipo de desórdenes metabólicos, sin embargo, son comunes en zonas templadas y específicamente con rebrotes de forraje en la primavera, mientras que en regiones tropicales son poco frecuentes (Littledike *et al.*, 1983). El elevado contenido de K en forrajes típicos del trópico alto como el kikuyo (hasta 5,12% de la MS) (Correa *et al.*, 2008) están relacionados con disfunciones en el metabolismo del Ca y del Mg (Goff, 2006).

En las ganaderías del país, el principal suplemento dietario es la sal mineralizada (MADR, 2010) y en ganado en periodo preparto, se han utilizado mezclas de macrominerales en forma de sales anionicas combinándolas con suplementación de Ca y Mg para la prevención de la hipocalcemia e hipomagnesemia (Underwood y Suttle, 1999). El contenido de Mg de fuentes inorgánicas va desde 5% en el fosfato de Mg hasta un 52% en la magnesita calcinada (FEDNA 2012).

Numerosos estudios han reportado las ventajas y los efectos positivos de la suplementación inorgánica de minerales (Aholay *et al.* 2004), así como su biodisponibilidad relativa (McDowell 1996, Parsi *et al.*, 2001). Los iones como el carbonato, cloruro, oxido y sulfato han presentado valores de biodisponibilidad altos (McDowell 1996), su absorción oscila entre 30 y 70% (NRC 2001) y su solubilidad en medios acuosos depende en gran medida al tipo de sal (NIST 2011).

Tabla 2.1. Solubilidad en medios acuosos de las fuentes minerales evaluadas

Fuente Mineral	Solubilidad en agua (g/100mL)
MgO	0,0086 [*]
MgCO₃	10,6 ^{**}
MgSO₄	35,5 ^{***}
MgCl₂	54,2 ^{***}

Adaptado de ^{*} De Baat 1926. ^{**} NIST standard reference database 2011. ^{***} National Library of Medicine - Medical Subject Headings 2006. ^{****} Royal Society of chemistry - Chemspider.

Se ha reconocido al rumen como el principal sitio de absorción del Mg en rumiantes adultos (Martens y Blume, 1986; Care *et al.*, 1984; Greene *et al.*, 1983), donde bajos niveles de pH (Cook *et al.* 1994) y altos contenidos de K en forraje (Fontenot *et al.* 1973, Tomas y Potter 1976) pueden disminuir su solubilidad. En Colombia se han reportado, valores iniciales de liberación ruminal de Mg en pasto kikuyo superiores al 70% (Correa *et al.* 2008) y hasta 93% a las 72 horas de incubación en rumen (Moseley y Griffiths 1984, Van Eys y Reid 1987) Sin embargo, Se desconocen trabajos en los que se halla estimado la liberación ruminal del Mg a partir de fuentes Inorgánicas incubadas como sales puras y utilizando la técnica *In situ*. Por ello el objetivo de este trabajo fue evaluar la desaparición de cuatro fuentes inorgánicas de Mg por medio de la técnica *in situ* utilizando dos tamaños de poro en la bolsa de nailón.

2.3. Materiales y Métodos

2.3.1. Localización

La investigación se realizó en la granja experimental Paysandú de la Universidad Nacional de Colombia, ubicada en el municipio de Santa Elena (Medellín, Antioquia) a 2538 msnm y que pertenece a la zona de vida de Bosque húmedo montano bajo (bH – MB) (Holdridge, 1996).

2.3.2. Animales experimentales.

Se utilizaron tres vacas de la raza Holstein, adultas no lactantes, canuladas al rumen, con un peso y edad promedio de 620 ± 14 Kg y 7 años, respectivamente. Dichos animales fueron alimentados a voluntad con pasto kikuyo. Los animales experimentales fueron trasladados del potrero hacia el corral de manejo situado al lado del ordeño a las 07:00 am el día del experimento, donde se realizó la extracción de la tapa de la cánula y la incubación de los sustratos a evaluar.

2.3.3 Preparación de las muestras

Se tomaron aproximadamente 0,5 g de cada una de las fuentes inorgánicas a evaluar; óxido de Mg (MgO), sulfato de Mg ($MgSO_4$), cloruro de Mg ($MgCl_2$) y carbonato de Mg ($MgCO_3$) cuyas solubilidades se presentan en la tabla 2,6. Dichos compuestos fueron empacados en dos tipos de bolsas de Nylon: bolsas FN° 57 Ankom® con un tamaño de poro de $25 \mu m$ y dimensiones de 5×4 cm (para obtener un área efectiva por bolsa de 37 cm^2) compuestas por un material tipo poliéster, y bolsas elaboradas con tela nacional (Brioni®-Lafayette) con un tamaño de poro de $50 \mu m$, implicando un menor costo.

Se determinó el tamaño de partícula de cada fuente, tomando fotografías con zoom óptico de 20X a las partículas de las cuatro fuentes minerales a evaluar ubicadas sobre una hoja de papel milimetrado con divisiones de 500 y $1000 \mu m$ (ver anexos), esto con la finalidad de establecer su relación con el tamaño del poro de las bolsas evaluadas. Se tomaron 11 observaciones de cada una de las fuentes minerales evaluadas y se presenta el promedio y la desviación estándar del tamaño de cada una de las fuentes. Esta metodología fue implementada por los participantes del estudio por no contar en el momento con un microscopio acondicionado para esta medición.

En cada una de las bolsas se depositaron aproximadamente 0,5 g de muestra (Goering y Van Soest, 1970) lo que corresponde a una relación tamaño de la muestra/superficie de la bolsa de 13.5 mg/cm² (Van Hellen y Ellis, 1977). Posteriormente las bolsas fueron selladas con calor por medio de un sellador eléctrico (Orskov *et al.*, 1980). Cada una de las bolsas fue introducida en una malla de plástico de acuerdo al tiempo de incubación correspondiente y finalmente las mallas fueron atadas por medio de una cuerda de cáñamo a mosquetones fijados a una cadena de hierro cromado de 1.0 m de longitud.

2.3.4 Incubación de las bolsas.

Previo a la incubación se realizó un enjuague de las bolsas en agua a 39°C durante 2 minutos, posteriormente se incubaron las bolsas en el rumen. Al momento de la incubación, se determinó el pH ruminal mediante un potenciómetro portátil (WTW 315I®). Se introdujo una bolsa por cada tiempo (0, 12, 24), por cada tamaño de poro, por cada fuente mineral evaluada y en cada animal, de tal forma que se introdujeron un total de 24 bolsas por animal.

Las bolsas fueron introducidas al rumen al mismo tiempo en las tres vacas comenzando con el tiempo más largo (24 horas) prosiguiendo con las bolsas de los demás tiempos (12 y 0 h), de tal manera que al final de la incubación, todas las bolsas fueron extraídas al mismo tiempo y se lavaron simultáneamente con agua de grifo hasta que el agua salió limpia (Nocek, 1988).

2.3.5. Determinación de la desaparición de la materia seca (DMS)

Las bolsas fueron secadas en una estufa de aire forzado a 65°C durante 48 horas, luego de lo cual fueron pesadas. A dicho peso se le restó el peso de la bolsa vacía para calcular la cantidad de muestra desaparecida en cada tiempo de incubación. De esta forma la DMS (parcial) fue calculada como se muestra a continuación:

Ecuación 2.1. Determinación de la desaparición de la materia seca

$$\%DMS = (((Pv+Pm)-Pbr)/Pm)* 100$$

Dónde:

Pm = Peso muestra (g)

Pv = Peso bolsa vacía (g)

Pbr = Peso Bolsa y el residuo

Fuente: Autor

2.3.6. Análisis estadísticos.

Se estableció el promedio y la desviación estándar del tamaño de partícula de cada fuente de Mg. Los datos de DMS fueron analizados bajo un diseño en bloques completos al azar con un arreglo factorial 2x3X4, donde los factores analizados fueron respectivamente, el tamaño del poro, el tiempo de incubación y las fuentes minerales. Los tres animales representaron los bloques, de acuerdo al siguiente modelo:

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

Donde Y_{ijk} es la desaparición de la materia seca; μ es la media poblacional; T_i es el efecto del i -ésimo tratamiento experimental; B_j es el efecto del j -ésimo bloque, y e_{ijk} es el error experimental. Para este análisis se utilizó el PROC GLM del programa estadístico SAS (2002) donde la variable respuesta a analizar fue la desaparición de la materia seca (DMS) expresada en %. Los resultados obtenidos son expresados como la Media \pm Error Estándar. Cuando se hallaron diferencias significativas, se aplicó la prueba de LSMEANS para el análisis de la diferencia entre los promedios.

Adicionalmente se adelantó un análisis de correlación entre la solubilidad de cada fuente y la DMS a la 24 h mediante el PROC CORR del programa estadístico SAS (2002).

2.4. Resultados y Discusión.

El pH promedio para los animales experimentales, medido antes de la introducción de las bolsas fue de $6,99 \pm 0,021$. Dicho pH es compatible al hallado para animales pastando praderas de forrajes tropicales fibrosos y sin suplementación alimenticia (García y Kalscheur 2006, Correa et al 2012, Duque 2013). Dicho valor es importante puesto que este se asocia con la solubilidad de las fuentes inorgánicas de minerales para rumiantes (Jessee et al 1980), (Ver tabla 2.1).

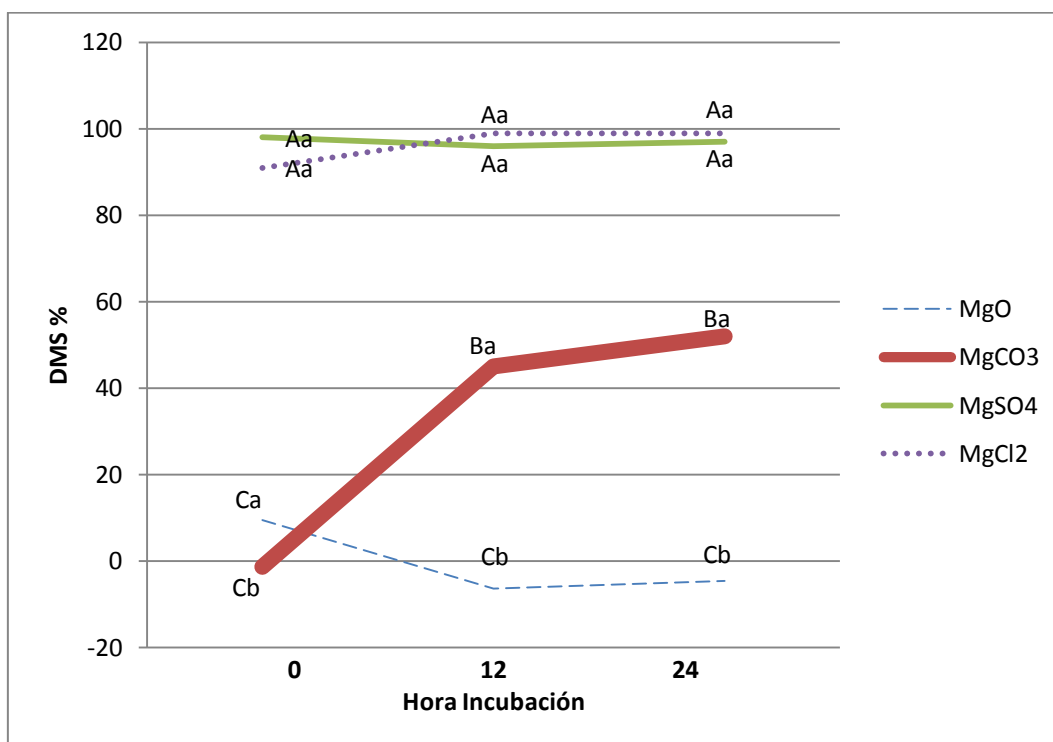
El tamaño promedio de partícula de las cuatro fuentes de Mg fue superior a $700 \mu\text{m}$ (Tabla 2.2), lo que puede indicar que la desaparición de las muestras de las bolsas de nailon no fue causada por el tamaño de partícula de la fuente mineral si no, por su solubilidad en el medio ruminal, toda vez que los tamaños de poro evaluados fueron 25 y $50 \mu\text{m}$.

2.2. Tamaño de partícula para las Fuentes minerales evaluadas.

Partícula	MgO	MgCO ₃	MgSO ₄	MgCl ₂
Muestreada*				
μm				
PROMEDIO	963,6	743,6	992,7	700,0
D. E.	317,9	240,7	459,0	280,2

* Los promedios provienen del muestreo de 11 partículas (ver Anexos)

Grafica 2.1. Efecto de la fuente mineral y el tiempo de incubación sobre la DMS (%)



Literales diferentes en mayúsculas indican diferencias en el tiempo
 Literales diferentes en minúsculas indican diferencias dentro de la fuente

No se evidenció efecto de la triple interacción entre la fuente, el tamaño del poro y el tiempo evaluado ($p=0,92$). Con respecto a la interacción de primer nivel, solamente se observó efecto de la interacción entre el tiempo de incubación en rumen y la fuente mineral ($p<0,0001$). Resultados similares son reportados por Correa (2007) en los que el Mg contenido en forraje kikuyo presenta una alta desaparición ruminal a las 0 horas (70%) y a las 24 horas alcanza una desaparición superior al 90%. Igualmente, Gojon et al (1998) observaron que los principales macrominerales (Ca, P, Mg, K) presentaban a las 24 horas una desaparición ruminal *in situ* de aproximadamente 85%.

Tabla 2.3. **Efecto del tamaño del poro, fuente mineral y tiempo de incubación sobre la desaparición de materia seca DMS de las fuentes minerales evaluadas.**

EFEECTO EVALUADO	gl	Suma cuadrado tipo III	Cuadrado Medio Calculado	F	p
Tamaño de poro	1	0,1586	0,1586	10,55	0,0022
Tiempo de Incubacion	2	0,1821	0,09107	6,05	0,0046
Animal	2	0,022	0,0113	0,75	0,4775
Fuente Mineral	3	12,8286	4,2762	284,26	<0,0001
Poros x Tiempo	2	0,0062	0,0031	0,21	0,8142
Poros x Fuente	3	0,1133	0,0377	2,51	0,0703
Tiempo x Fuente	6	0,9584	0,1597	10,62	<0,0001
Poros x Tiempo x Fuente	6	0,0288	0,0048	0,32	0,9233

No se observaron efectos significativos del tiempo de medición sobre el nivel de DMS para $MgCl_2$ ni para $MgSO_4$ ($p=0,74$) (gráfica 1.1). De hecho estas dos fuentes fueron estadísticamente superiores en todas las mediciones a las otras dos fuentes evaluadas (MgO , $MgCO_3$) ($p<0,0001$). La descripción técnica del cloruro y el sulfato de Mg demuestra que estas dos fuentes presentaban los mayores valores de solubilidad (54,2 y 35,5 g/100mL, respectivamente) (Royal Society of Chemistry).

La DMS del $MgCO_3$ y del MgO fue baja en el tiempo 0, pero luego se incrementó la del $MgCO_3$ mientras que la del MgO presentó valores negativos, indicando el atrapamiento de contenido ruminal.

Un análisis de correlación entre la solubilidad en medio acuoso y la DMS a las 24 h ($r=0,93$ y $r=0,90$ para las bolsas de 50 y 25 μ , respectivamente), mostró que existe una asociación alta entre estos dos parámetros y que, por lo tanto, a mayor solubilidad de la fuente, mayor es la desaparición de la muestra de las bolsas de nailón. Se ha descrito que tanto el tamaño de partícula (Quin et al 1938) como la solubilidad (Ortega y Carranco 1993) como factores que afectan la desaparición ruminal de la materia prima incubada en la bolsa de nylon. Es posible que bajo las condiciones del presente estudio el efecto ejercido por el

tamaño de partícula sobre la desaparición ruminal sea dependiente de una característica inherente a la materia prima evaluada como la solubilidad.

2.4.1. Efecto del tamaño del poro.

Los tamaños de poro utilizados en este estudio se encuentran dentro del rango recomendado por un gran número de autores (Van Hellen y Ellis 1977, Uden y Van Soest 1984, Lindberg 1984, Nocek 1985, 1988, Vanhatalo, 1995, Hvelplund y Weisbjerg 2000). No obstante que el tamaño de las partículas de las fuentes evaluadas (Tabla 2.2) superó varias veces el tamaño de poro más grande evaluado en las bolsas (50 μm), dicho factor afectó la DMS de las fuentes, siendo estadísticamente menor con las bolsas de 25 μm (51,7%) ($p < 0,002$) que con las de 50 μm (61,1%). En este sentido cabe anotar que una proporción de dichas partículas (ver anexos) tenían un tamaño inferior y suficiente para escapar por los poros y además, con la motilidad y la humedad ruminal, muchas partículas redujeron su tamaño, lo cual facilitó su salida. Otros autores también han reportado una reducción en la digestibilidad de las muestras incubadas cuando el tamaño del poro de la bolsa es menor. Lindberg y Knutsson (1981) obtuvieron disminuciones significativas en la DMS y desaparición de N al trabajar con tamaños de poro de 80 a 120 μm . En este mismo trabajo, los autores observaron que al utilizar poros más pequeños (10 - 36 μm) y aumentar el tiempo de remojo previo a la incubación (6 horas con agitación) se disminuía la DMS.

Giraldo *et al.* (2007) por el contrario, observaron una mayor digestibilidad *in vitro* de la materia seca en kikuyo determinada por la técnica del Daisy ^{II®} con tamaño de poro de 20 μm que con la técnica *in situ* con bolsas de nailón cuyo tamaño de poro era de 50 μm . Este último resultado, sin embargo, pudo deberse a la diferencia en la relación tamaño de muestra: área efectiva de la bolsa, que habría favorecido las muestras evaluadas por la técnica Daisy ^{II®}, como lo indica los trabajos de Goering y Van Soest, 1970. Así mismo, Van Hellen y Ellis (1977) han relacionado la DMS con la relación entre el tamaño de

la muestra ingresada en cada bolsa y el área de cada cara de la bolsa incubada.

2.4.2 Efecto del tiempo y la fuente sobre la DMS (%)

Se observó en el MgO una disminución significativa en la DMS luego de la hora 0 de incubación ($p < 0,03$), presentando incluso valores negativos a las 12 y 24 horas, que no fueron diferentes entre sí ($p = 0,79$). En este sentido, Jesse et al (1981) trabajaron con tamaños de partícula del MgO similar al del presente estudio, obteniendo un bajo nivel de DMS ($< 50\%$), así mismo, Morgan (2011) experimentando con vacas lecheras fistuladas que presentaron un pH ruminal similar al del presente estudio (6,5) observaron una DMS baja incubando MgO durante 96 horas. Por ello al tener las condiciones experimentales bajo las cuales se trabajaron en el presente experimento se esperaría una baja desaparición ruminal.

Los valores bajos de DMS se correspondieron con los menores valores de solubilidad reportados para esta fuente (0,0086g/100mL) (De Baat 1926). Los valores negativos hallados, podrían responder al ingreso de materiales propios del rumen a través de los poros, que aunado a la baja solubilidad del MgO, generaron valores negativos de DMS. Nocek (1988) indica que al trabajar con materiales con tamaño de partícula grande ($> 90\mu\text{m}$) la DMS disminuía significativamente. Igualmente Ceballos et al (2008) indican como opción para evitar datos negativos de DMS incubar una bolsa vacía por cada tratamiento, no obstante en el presente estudio no se realizó este procedimiento por no estar recomendado por la mayoría de la literatura relacionada con la técnica *in situ*.

El MgO utilizado en el presente estudio tenía un tamaño de partícula de $963,9 \pm 317\mu\text{m}$ y las bolsas utilizadas tenían tamaños de poro de 25 y 50 μm de tal manera que es posible que debido a este impedimento físico la mayoría de las partículas de MgO no hayan abandonado las bolsas de nailón. El tamaño de partícula del MgO utilizado en el presente estudio (MgO técnico) fue superior al reportado previamente por Schaefer *et al.* (1982) y por Xin *et al.* (1988) quienes

trabajaron con MgO comercial con tamaño de partícula de 0.09 y 3.7 μ m, respectivamente. Es posible que la diferencia entre este estudio y los citados previamente es que en dichos estudios el MgO hizo parte de una mezcla de alimentos que fue incubada en el rumen.

En reportes previos, Xin *et al.* (1988) midieron la solubilidad de MgO al introducir este compuesto con diferentes tamaños de partícula en soluciones ácidas de HCl (pH entre 1,3 y 5,6) revelando que a menor tamaño de partícula (237 μ) y a menor pH (1,3) la solubilidad de esta sal fue mayor. Numerosos autores han reportado para ganado Holstein en pastoreo sin suplementación valores de pH ruminal de entre 6,0 y 6,79 (Holden *et al.* 1994, Reis y Combs 2000, Bargo *et al.* 2002, García y Kalscheur 2006, Correa *et al.* 2012, Duque 2013), lo que coincide con los hallados en este trabajo.

La utilización de este tipo de materiales (específicamente MgO) se restringe a la adición del producto comercial a dietas total o parcialmente mezcladas como tal, sin ningún proceso de molido o de filtrado (Emery *et al.*, 1965; Askew *et al.*, 1971; Schaefer *et al.*, 1982). En el presente experimento el MgO no fue molido o filtrado pudiendo presentar partículas que por su tamaño, no lograron solubilizarse en el rumen. Aún a las 24 horas post-incubación se registraron DMS negativas, por lo que se puede sospechar inicialmente, que el óxido ligo partículas del medio ruminal. En este respecto, las reglas de solubilidad coinciden en afirmar que los óxidos de un ion metálico no son solubles en agua y tienden a la formación de hidróxidos (Morgan 2011)

Lough *et al.* (1990), por su parte, encontraron que la solubilidad del MgO es alta a las 24 horas en líquido ruminal cuyo pH inicial osciló entre 6,95 y 6,99. Dicha solubilidad fue de 91,8% sugiriendo que aún a pH altos, esta fuente puede ser muy soluble. Es necesario tener en cuenta, sin embargo, que la solubilidad calculada por estos autores, fue la proporción de Mg hallado en la fase líquida frente a la fase sólida, luego de centrifugar el líquido ruminal. Lamentablemente en este estudio no se reportó el tamaño de partícula con la que se trabajó por lo que no se puede hacer ninguna inferencia al respecto. Los resultados de estos autores sin embargo contradicen la baja solubilidad reportada para el

MgO (*Reference Tables for Physical Setting - Chemistry* 2011.) sugiriendo que se pueda tratar más de un error metodológico, que de una solubilidad real.

Otros autores, han reportado valores de digestibilidad negativos para Mg (Emanuelle et al 1991) y para el Ca (Emanuelle et al 1991, Correa et al 2008), asociados a la quelación de estos iones divalentes con la materia orgánica del rumen, particularmente con la fibra. Es probable, entonces, que parte del valor negativo de la DMS observada para esta fuente, fuera debido a la quelación de componentes orgánicos por parte del MgO.

El MgO ha sido utilizado en las dietas de vacas lecheras para prevenir problemas de acidosis ruminal (Erdman *et al.*, 1980, 1982; Schaefer *et al.*, 1981) gracias a su capacidad de consumir iones H^+ y por tanto, de formación de enlaces con otros compuestos. No obstante, de acuerdo a los resultados observados en el presente estudio, se puede esperar que la solubilización de este material a nivel ruminal sea menor que las demás fuentes evaluadas ya sea por su baja solubilidad en medios acuosos, por el pH presente en el rumen o por el impedimento físico del tamaño del poro utilizado.

Por el contrario, en el $MgCO_3$ se observó un aumento significativo ($p < 0,001$) y constante en la DMS a partir del tiempo 0 de incubación hasta las 24 horas. La DMS a las 24 h hallada en esta fuente puede estar relacionada con su naturaleza química, ya que al ser una sal anhidra presenta una solubilidad muy superior que la del MgO.

De acuerdo a los valores reportados en la tabla 2.2, la solubilidad de este carbonato sería 1200 veces superior a la del óxido. Sin embargo, todas las formas de $MgCO_3$ son poco solubles en condiciones neutras y básicas e incrementan su solubilidad en medios que tienden a la acidez (Patnaik y Pradyot 2003). En este sentido Scandolo et al (2007) observaron una disminución constante del pH ruminal a lo largo del día en vacas lecheras. De esta forma, la DMS del $MgCO_3$ registrada en el presente experimento siguió el comportamiento esperado, toda vez que aumentó a lo largo del día (las bolsas fueron incubadas a las 08:00) es decir la DMS aumentó a medida que

disminuye el pH ruminal coincidiendo con las observaciones realizadas por dichos autores.

Bajo las condiciones de pH del ambiente ruminal de las vacas experimentales trabajadas en este ensayo, era de esperarse una baja solubilidad aunque mayor que la del MgO, tal y como se encontró.

El tamaño de partícula del MgCO₃ utilizado en el experimento fue de 740 μm , menor al del MgO; a pesar de esto, la consistencia del carbonato era tal que al entrar en contacto con una solución acuosa, producía una masa de disolución lenta lo que pudo disminuir la liberación inicial del material a través de los poros. No obstante, no se observaron valores negativos de DMS y por el contrario este parámetro aumentó significativamente hasta alcanzar aproximadamente un 50% de DMS a las 24 horas de incubación.

El MgSO₄ y el MgCl₂ presentaron los valores más altos de DMS sin que hubiese diferencias entre ellos durante los tres periodos de incubación ruminal. Esto puede ser debido a la mayor solubilidad de estas dos fuentes comparadas con la del MgO y la del MgCO₃ (Tabla 2.1). La diferencia en la solubilidad entre estas dos fuentes (35,5 y 54,2 g/100 mL para el MgSO₄ y el MgCl₂, respectivamente), no influyó en la DMS en ninguno de los tiempos de incubación debido a que la cantidad necesaria para precipitarse (17750 y 27100 g en 50 L de licor ruminal), es mucho mayor que la que se incubó en las bolsas experimentales (1,5 g en 50 L de licor ruminal).

Dentro de las fuentes evaluadas, el MgSO₄ presentó el mayor tamaño de partícula (992 μm ver anexos), no obstante, al ser un compuesto altamente higroscópico (Hutjens 1991), incluso a temperatura ambiente, la absorción de agua por parte del material, disminuía notablemente el tamaño de las partículas que lo componían, facilitando su liberación a través de los poros.

El MgSO₄ se ha utilizado rutinariamente para corregir deficiencias de magnesio en cultivos de algunas hortalizas y cereales (Peña *et al.*, 2007), como

tranquilizante en cerdos (Panella-Rivera *et al.*, 2009), en ratones para evitar daños renales (Masuyama *et al.*, 1995) y en vacas lecheras con problemas de hipomagnesemia (Wittwer *et al.*, 1995). En el caso específico de vacas lecheras algunos autores (Capen y Rosol, 1989; Hoffsis *et al.*, 1989; Xin *et al.*, 1989; Contreras *et al.*, 1992) han afirmado que el suministro oral de MgSO_4 funciona en el tratamiento de vacas con hipomagnesemia, aumentando los niveles séricos del mineral.

En el presente experimento se utilizó MgCl_2 de grado técnico (con textura y granulometría diferentes al comercial) que presentó el menor tamaño de partícula de todas las fuentes evaluadas (700 μm , Tabla 2.2). Esta característica, sumada al hecho de que este material fuera higroscópico, hizo que su liberación y sobre todo su solubilización fueran más rápidos que en las demás fuentes minerales evaluadas (Jittakhot *et al.* 2004).

En un estudio de cinética de liberación de pasto kikuyo (Correa, 2007) trabajando con una metodología similar, se observó que la liberación ruminal del Mg presente en el forraje era inicialmente rápida (70 - 80% en las primeras dos horas) para aumentar hasta las 24 horas sin que mostrará un incremento adicional durante las siguientes 48 horas de incubación, un patrón de comportamiento similar al observado con el MgSO_4 y el MgCl_2 , en el presente estudio aunque de menor magnitud. Sin embargo, la solubilidad del Mg contenido en sales puras es más extensa y rápida que la reportada en el Mg contenido en forrajes, teniendo en cuenta que la naturaleza inorgánica de las sales puras influye en la solubilidad. Cole (2000) por otro lado, observó luego de 30 minutos del consumo de forrajes tiernos y concentrados, un incremento significativo de la concentración ruminal de Mg.

Normalmente la concentración de Mg en el fluido ruminal puede cambiar rápidamente a lo largo del día, dependiendo del suministro dietario del mineral (Scandolo *et al.*, 2007). Por ello, al contar con una liberación rápida y alta de Mg en el rumen como sucede con el MgCl_2 y el MgSO_4 , se puede esperar que su función como estimulante en la actividad microbiana (Galbraith *et al.*, 1971; Rusell y Dombrowski, 1980), bufferizante (Rauch *et al.*, 2012; Erdman *et al.*,

1982, 1988; Xin *et al.*, 1989) y como cofactor en la actividad de algunas enzimas (Faixová y Faix, 2002; Faixová *et al.*, 2006) sea rápida luego de su consumo y que no se mantenga en el tiempo.

Como se pudo establecer, las fuentes de Mg evaluadas en este trabajo presentaron patrones de DMS diferentes indicando que su papel en el suministro de este mineral es igualmente distinto y que, por lo tanto, una mezcla de estas fuentes podría tener un efecto más positivo sobre el crecimiento microbiano y el cubrimiento de las necesidades del animal hospedero que una sola fuente de lenta, media o alta disponibilidad. Este sería un enfoque similar al que se ha propuesto para carbohidratos y proteínas en la elaboración de suplementos para rumiantes (Rotger *et al.* 2006, Cole y Todd 2007, Hall y Huntington 2007). Bajo este enfoque y haciendo parte de una mezcla en la que también estén presentes carbohidratos con diferente capacidad de fermentación, los cambios en el pH ocasionados por la degradación de los carbohidratos y las proteínas podrían favorecer tanto la liberación del Mg de estas fuentes como su absorción ruminal.

2.5. Conclusiones

La desaparición de la materia seca fue afectada por el tamaño del poro y por la interacción entre el tiempo de incubación y la fuente de Mg evaluada (Ver tabla 2.3). A pesar de que el tamaño de partícula de todas las fuentes inorgánicas fue mucho mayor al de los tamaños de poro evaluados, la DMS de las muestras de las bolsas de nailon no fue afectada por el tamaño de partícula si no, por el tamaño del poro de las bolsas y por la solubilidad de la fuente en el medio ruminal.

La DMS registrada en las bolsas de 25 μ m fue inferior a la observada en las de 50 μ m siendo un efecto esperado y reportado previamente en la literatura. Para algunas fuentes minerales se observó alta variabilidad en el tamaño de partícula, de tal manera que una proporción de partículas con tamaño inferior pudieron escapar por los poros y otras redujeron su tamaño por efecto de la motilidad y la humedad ruminal. La relación entre la cantidad de muestra y el

área efectiva de la bolsa fue exactamente la misma en las bolsas Brioni® y las ANKOM®.

El MgO presentó la menor DMS a las 24 horas, registrando incluso valores negativos que estarían asociados con el tamaño de partícula, el pH ruminal de los animales experimentales y el bajo nivel de solubilidad en medio acuoso de esta sal. De igual forma, las propiedades inherentes de los óxidos de iones divalentes y su relación con la posible formación de quelatos pudo influenciar la DMS con valores negativos.

La consistencia del MgCO₃, el nivel medio de solubilidad y el pH ruminal causaron que esta fuente mineral haya alcanzado una DMS final menor a 50%. La DMS en todos los tiempos evaluados para el MgCl₂ y el MgSO₄ fue similar. No obstante, la DMS de estas dos fuentes fue superior a las demás sales de Mg durante los tres tiempos de incubación. Es posible que el lavado previo con agua de grifo y la naturaleza higroscópica de estas dos fuentes, hayan generado un valor de DMS superior en el primer tiempo de incubación.

La utilización de MgCl₂ o de MgSO₄ como fuentes inorgánicas en dietas para rumiantes garantiza una alta y rápida liberación de Mg debido a la mayor solubilidad de estas sales y por tanto, mayor disponibilidad para los microorganismos y la mucosa ruminal. Sin embargo, a nivel práctico es probable que la mezcla de fuentes que presenten un patrón acelerado de desaparición ruminal, que pueda ser más apropiada para cubrir las necesidades de las poblaciones microbianas y del animal hospedero.

Agradecimientos.

El autor Agradece al estudiante de zootecnia Santiago Jaramillo, al estudiante de Maestría Cesar Orrego y a la Ingeniera Carol Lizzeth Martínez por su colaboración en el trabajo de campo, la toma de datos y el procesamiento de las muestras. Al laboratorio de Nutrición Animal de la Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín por su colaboración con las instalaciones y los equipos necesarios para el desarrollo de este experimento. Al centro de

producción de Paysandú, en especial a Neftalí Ortiz por el apoyo logístico y la colaboración con los animales experimentales.

Abstract

Magnesium is an abundant mineral in the forages using in the dairy cattle, acting as a cofactor in enzymatic reactions for the main metabolic pathways. It has been established that the ruminal release of high tropic forage magnesium is high. The aim of this study was to assess the ruminal release of four inorganic magnesium sources incubated in a pure salt form, determined by the dry matter disappearance (DMD) of magnesium oxide (MgO), magnesium sulfate (MgSO₄), magnesium carbonate (MgCO₃) and magnesium chloride (MgCl₂). It was used three Holstein cows (620 Kg – seven years) located in Santa Elena – Antioquia (2538 masl; bH – MB; 16°C) grazing kikuyo (Cenchrus clandestinum) ad libitum. For the In situ trial, 0,5g from each source was packed in nylon bags with two different pore sizes (25 y 50µm) (by triplicate) that were incubated in the rumen of the cannulated cows. The DMS was evaluated in three times (0, 12 y 24h). A complete randomized block design was used, with a factorial arrangement 2x4 (two pore sizes and four mineral sources) and a Tukey test to determine the statistical significance of the differences between the medias. No effect from animal ($p>0.13$) nor pore size ($p>0.11$) but the mineral source ($p<0.0001$) and no evidence of significant interaction between the source and the pore size. MgCl₂ (99.7%) and MgSO₄ (97.2%) exhibited the higher release percentages at 24h ($p<0.0001$), meanwhile MgO (-4,3%) showed the lowest DMS at 24h. There were no significant differences in the average DMS at 24 hours between the two pore sizes; however the DMS of the 50µ pore size was numerically higher. The hygroscopic nature of MgCl₂ and MgSO₄ can affect the initial determination of DMS. The sources with the higher DMS have at the same time the higher solubility in water. According to the results obtained in the experiment, it can be stated that factors such as ruminal pH, solubility in water and the particle size can affect the DMS of inorganic sources of Mg incubated in the rumen in a pure salt form.

Keywords: *Holstein, Ruminal liquor, In situ technique, Kikuyo, ANKOM, BRIONI*

Bibliografía Citada.

1. Adediji, O. and Suttle, N.F. 1999 Influence of diet type, potassium and animal species on the absorption of magnesium by ruminants. *Proceedings of the Nutrition Society* 58, 31A
2. Ahola J. K. Baker D. Burns P. Mortimer R. Enns R. Whittier J. Geary T and Engle T. 2004. Effect of copper, zinc, and manganese supplementation and source on reproduction, mineral status, and performance in grazing beef cattle over a two-year period^{1, 2, 3}. *J. Anim. Sci.* 2004. 82:2375–2383
3. Aikawa, J. K. 1981. Magnesium. Its biological significance. CRC Press, Boca Raton, FL.
4. Akers R and Denbow D. 2008. *Anatomy and Physiology of domestic animals* Cap: 6, 138. Blackwell Publishing Ltd.
5. Allen, V. G. and J. P. Fontenot. 1984. Influence of aluminum as sulfate, chloride and citrate (m magnesium and calcium metabolism in shccp. *J. Anita. Sci.* 59:798.
6. Allcroft, R and K. N. Burns. 1968. Hypomagnesemia in cattle. *N. 2. Vet. J.* 16:109.
7. Askew E. Benson J. Thomas J. Emery R. 1971. Metabolism of Fatty Acids by Mammary Glands of Cows Fed Normal, Restricted Roughage, or Magnesium Oxide Supplemented Rations. *Journal of Dairy Science*, Volume 54, Issue 6, June 1971, Pages 854–862
8. Atteh JO, Leeson S. 1983. Influence of increasing dietary calcium and magnesium content of the drinking water on performance and bone and plasma minerals of broiler chickens. *Poultry Sci* 62:869
9. Atteh JO, Leeson S. 1986. Influence of increasing dietary calcium and magnesium levels on performance mineral metabolism and egg mineral content of laying hens. *Poultry Sci* 64:1261–1268.

10. Beede D. Hirschert E. Lough D. Sanchez W. Wang C. 1989. Solubility of magnesium from feed grade sources in an in vitro ruminal + abomasal system. In proceedings of the 26th florida dairy production conference. Pp 45—4., Univeersity of florida Gainesville.
11. Bender D, Mayes P. 2003 Vitamins & Minerals. In Harper's Illustrated Biochemistry. Cap 45 p489
12. Bell M. Oluokun J. Ramsey N. Beckman G. 1978. Magnesium treatment of cows for grass tetany. *Feedstuffs* 50(6)24.
13. Care A. Brown R. Farrar A. 1984. Magnesium absorption from the digestive tract of sheep. July 1, 1984 *Experimental Physiology*, 69, 577-587.
14. Chemisquy, M. A. et al. 2010. Phylogenetic studies favour the unification of *Pennisetum*, *Cenchrus* and *Odontelytrum* (Poaceae): a combined nuclear, plastid and morphological analysis, and nomenclatural combinations in *Cenchrus*. *Ann. Bot. (Oxford)* 106:107–130
15. Church. D. E. 1988. El rumiante, fisiologia digestiva y nutricion 1988, Editorial Acribia SA P, Cap. 8; 168-172, Cap. 3; 283
16. Cole N. Todd R. 2007. Opportunities to enhance performance and efficiency through nutrient synchrony in concentrate-fed ruminants. *J Anim Sci* April 2008 vol. 86 no. 14 suppl E318-E333.
17. Cole NA. 2000. Changes in postprandial plasma and extracellular and ruminal fluid volumes in wethers fed or unfed for 72 hours. *J Anim Sci* 78, 216-223.
18. Conn E. Stumpf P. Bruening G. Doi R. 2000. *Bioquimica Fundamental*. Cap 16 P 542-544
19. Cook N. Nordlund K. Oetzel G. 2004. Environmental Influences on Claw Horn Lesions Associated with Laminitis and Subacute Ruminant Acidosis in Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*, Volume 87, Supplement, July 2004, Pages E36–E46.
20. Correa H J 2007 Cinética de la liberación ruminal de macrominerales en pasto kikuyo (*Pennisetum clandestinum*) cosechado a dos edades de rebrote. *Livestock Research for Rural Development*. Volume 18, Article # 31 Retrieved junio 17, 2006, from

21. Correa H.J, Pabón M, Carulla J.E 2008; Valor nutricional del pasto kikuyo (*Pennisetum clandestinum* Hoechst Ex Chiov.) para la producción de leche en Colombia (Una revisión): I - Composición química y digestibilidad ruminal y posruminal *Livestock Research for Rural Development* 20 (4)
22. Correa H. Rojas H. Ceron J. Pabon M. Carulla J. 2011. MUN: herramienta para mejorar el contenido de proteína en la leche. VII seminario Competitividad en carne y leche, Cooperativa Colanta.
23. Daryl K, Granner M. 2003 The Diversity of the Endocrine System. In *Harper's Illustrated Biochemistry*. Cap 42 p441
24. De Baat W.C. 1926. *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas*, Vol 45, pp 237
25. Ding Y. Zhang G. Wu H. Hai B. Wang L. Qian Y. 2001. Nanoscale Magnesium Hydroxide and Magnesium Oxide Powders: Control over Size, Shape, and Structure via Hydrothermal Synthesis. January 12, 2001 Copyright © 2001 American Chemical Society
26. Douglas G, Overton T, Bateman H, Dan H, Drackley J. 2006. Prepartal Plane of Nutrition, Regardless of Dietary Energy Source, Affects Periparturient Metabolism and Dry Matter Intake in Holstein Cows. *J. Dairy Sci.* 89:2141–2157
27. Drackley, J. K., H. M. Dann, G. N. Douglas, N. A. Janovick Guretzky, N. B. Litherland, J. P. Underwood, and J. J. Loo. 2005. Physiological and pathological adaptations in dairy cows that may increase susceptibility to periparturient diseases and disorders. *Ital. J. Anim. Sci.* 4:323-344.
28. Dua, K. and Care, A.D. 1995. Impaired absorption of magnesium in the aetiology of grass tetany. *British Veterinary Journal* 151, 413–426.
29. Duque M. 2013. Efecto de la suplementación con ácidos grasos protegidos ricos en n-3 y n-6 sobre los parámetros productivos, reproductivos y balance energético en vacas holstein. Contenido en línea: < <http://hdl.handle.net/10495/1637>>
30. Emanuele S M, Staples C R and Wilcox C J 1991 Extent and site of mineral release from six forage species incubated in mobile dacron bags. *Journal of Animal Science.* 69: 801. <http://jas.fass.org/cgi/reprint/69/2/801>

31. Emery S. Brown L. Bell J. 1965. Correlation of Milk Fat with Dietary and Metabolic Factors in Cows Fed Restricted-Roughage Rations Supplemented with Magnesium Oxide or Sodium Bicarbonate. *Journal of Dairy Science*, Volume 48, Issue 12, December 1965, Pages 1647–1651.
32. Erdman R. A. 1988. Dietary Buffering Requirements of the Lactating Dairy Cow: A Review. 1988 *J Dairy Sci* 71 : 3246—3266.
33. Erdman R.A Hemken R.W. Bull L.S. 1982. Dietary Sodium Bicarbonate and Magnesium Oxide for Early Postpartum Lactating Dairy Cows: Effects on Production, Acid-Base Metabolism, and Digestion. 1982 *J Dairy Sci* 65:712-731
34. Erdman, R. A., R. L. Botts, R. W. Hemken, and L. S. Bull. 1980. Effect of dietary sodium bicarbonate and magnesium oxide on production and physiology in early lactation. *J. Dairy Sci.* 63:923– 930.
35. Espinoza J. McDowell R. Wilkinson N. Conrad J. Martin F. 1991. Forage and soil mineral concentrations over a three-year period in a warm climate region of central Florida. I. Macrominerals. *Livestock Research for Rural Development*. Volume 3, Number 1, March 1991
36. Faixová Z, Faix F. 2002. Influence of metal ions on ruminal enzyme activities *Acta vet. Brno* 2002, 71: 451–455
37. Faixová zita, faix, maková, váczy, prosbová. 2006. Effect of divalent ions on ruminal enzyme activities in sheep. *Acta veterinaria (beograd)*, V56(1), 17-23,
38. FEDNA. Fundacion española para el desarrollo de la nutricion animal. Informacion en línea: <http://www1.etsia.upm.es/fedna/tablas.htm#subc>
39. Fiems, L. O., B. G. Cottyn, Ch. V. Boucque´, J. M. Vanacker, and S. De Campeneere. 1999a. Effect of different degraded protein balances (OEB) on the performance of beef bulls and on digestibility and rumen fermentation in sheep. *Neth. J. Agric. Sci.* 47:17–28.
40. Field, A.C. and Munro, C.S.M. 1977. The effect of site and quantity on the extent of absorption of Mg infused into the gastro-intestinal tract of sheep. *Journal of Agricultural Science, Cambridge* 89, 365–371.

41. Fontenot J, Wise M, Webb K. 1973. Inter-relationships of potassium, nitrogen and magnesium in ruminants. 1973. Fed. Proc. 32: 1925 – 1928.
42. Gaál K, Sáfár O, Gulyás L, Stadler P. 2004. Magnesium in Animal. Journal of the American College of Nutrition, Vol. 23, No. 6, 754S–757S (2004). Nutrition <http://www.jacn.org/content/23/6/754S.full.pdf>
43. Galbraith, H., Miller, T. B., Paton, A. M. and Thompson, J. K. 1971. Antibacterial Activity of Long Chain Fatty Acids and the Reversal with Calcium, Magnesium, Ergocalciferol and Cholesterol. Journal of Applied Microbiology, 34: 803–813. doi: 10.1111/j.1365-2672.1971.tb01019.x
44. García, A. & Kalscheur, K. 2006. Tamaño de particular y Fibra efectiva en la dieta de las vacas lecheras College of Agriculture and Biological Sciences. South Dakota State University. USA. p 5. Disponible: <<http://agbiopubs.sdstate.edu/articles/ExEx4033S.pdf>>.
45. Giraldo L, Gutierrez L, Rúa C. 2007. Comparación de dos técnicas in vitro e in situ para estimar la digestibilidad verdadera en varios forrajes tropicales. Rev Col Cienc Pec 2007; 20:269-279.
46. Goering HK and VanSoest PJ. 1970. Forage Fiber Analyses (Apparatus, Reagents, Procedures, and Some Applications). USDA Agricultural Research Service. Agricultural Handbook No. 379
47. Goff J. 2006. Macromineral physiology and application to the feeding of the dairy cow for prevention of milk fever and other periparturient mineral disorders. Animal Feed Science and Technology 126 (2006) 237–257
48. Gojon H, Siqueiros D, Contreras H. 1998. Digestibilidad ruminal y degradabilidad in situ de macrocystis pyrifera y sargassum spp. en ganado bovino. Ciencias Marinas, vol. 24, núm. 4, diciembre, 1998, pp. 463-481, Universidad Autónoma de Baja California México
49. Gring E, Males J. 1988. Performance, blood and ruminal characteristics of cows receiving monensina and magnesium supplement. J. Animal Science 66:566.
50. Hall M, Huntington G. 2008. Nutrient synchrony: Sound in theory, elusive in practice. J Anim Sci April 2008 vol. 86 no. 14 suppl E287-E292.
51. Harris, B., Jr., H. H. Van Horn, K. E. Manookian, S. P. Marshall, M. J. Taylor, and C. J. Wilcox. 1983. Sugar-cane silage, sodium hydroxide and

- steam pressure-treated sugarcane bagasse, corn silage, cotton seed hulls, sodium bicarbonate and aspergillus oryzae product in complete rations for lactating cows. *J. Dairy Sci.* 66:1474.
52. Holden, L. A., L. D. Muller, and S. L. Fales. 1994. Estimation of intake in high producing Holstein cows grazing grass pasture. *J. Dairy Sci.* 77:2332–2340.
53. Holdridge L. 1996. *Ecología basada en zonas de vida*. San José de Costa Rica: Instituto interamericano de cooperación para la agricultura.
54. Horn J. Smith R. 1978. Absorption of magnesium by young steer. *Br. J. Nutr.* 40:473-484. 1978.
<http://www.cipav.org.co/lrrd/lrrd18/2/corr18031.htm>.
55. Hutjens M. 1991. *Feed Additives: Which, When, and Why*. livestocktrail.illinois.edu
56. Jesse, B. W., J. W. Thomas, and R. S. Emery. 1981. Availability of magnesium from magnesium oxide particles of differing sizes and surfaces. *J. Dairy Sci.* 64:197.
57. Kohn R. A., Dinneen M. M. and Russek-Cohen E. 2005. Using blood urea nitrogen to predict nitrogen excretion and efficiency of nitrogen utilization in cattle, sheep, goats, horses, pigs, and rats. *J. Anim. Sci.* 83:879–889
58. Laporte JA, AR Sykes. 2004. Intestinal magnesium absorption in ruminant compensate by reduction in ruminal absorption. XI Congress International Society of Animal Clinical Biochemistry, Valdivia, Chile, Pp 47
59. Lee, S.R. and Britton, W.M. (1987) Magnesium-induced catharsis in chicks. *Journal of Nutrition* 117, 1907–1912.
60. Lidberg J. 1984. Nitrogen metabolism in sheep. 2. A comparison between rumen degradability of nitrogen an organic matter in sacco and in vivo in sheep fed rations and various protein supplements. *Swedish journal of agricultural research.* 14:37
61. Lindberg, J. E., and P. G. Knutsson. 1981. Effect of bag pore size on the loss of particulate matter and on the degradation of cell wall fibre. *Agric. Environ.* 6: 171.

62. Littledike, E., J. Stuedeman, S. Wilkinson, and R. Horst. 1983. Grass tetany syndrome. Pages 173–195 in Role of Magnesium in Animal Nutrition. J. Fontenot, G. Bunce, K. Webb, and V. Allen, eds. John Lee Pratt Annual Nutrition program. Blacksburg, VA.
63. Lough D. Beede D. Wilcox C. 1990. Lactational Responses to and In Vitro Ruminal Solubility of Magnesium Oxide or Magnesium Chelate. Journal of Dairy Science, Volume 73, Issue 2, February 1990, Pages 413–424
64. Madsen, J. and Hvelplund, T. 1994. Prediction of in situ protein degradability in the rumen: results of a European ringtest. Livestock Production Science 39, 201–212.
65. MAFF 1992. Feed composition – UK Tables of Feed Composition and Nutritive Value for Ruminants,
66. Marschner H. 1990. Functions of mineral nutrients: macronutrients; In: Mineral nutrition of higher plants. Academic Press, San Diego, CA. Chapter 8: 195 – 267
67. Martens H, M Schweigel. 2000. Pathophysiology of grass tetany and other hypomagnesemias. Implications for clinical management. Vet Clin N Am (Food Anim Pract) 16, 339-368.
68. Martens H. Harmeyer J. Breves G. 1973. In vitro studies on magnesium uptake by rumen epithelium using ²⁸magnesium nuclear techniques in animal production and health, Viena, 261-266, 1963.
69. Martens H. Harmeyer J. Michael H. 1978. Magnesium transport by isolated rumen epithelium of sheep. Res.Vet. Sci. 24:261-268.1978.
70. Martens, H. and Blume, I. 1986. Effect of intraruminal sodium and potassium concentrations and of the transmural potential difference on magnesium absorption from the temporarily isolated rumen of sheep. Quarterly Journal of Experimental Physiology 71, 409–415.
71. Martens, H., Schweigel, M., 2000. Pathophysiology of grass tetany and other hypomagnesemias. Implications for clinical management. Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 16, 339–368.
72. Masuyama R, Uehara M, Suzuki K, Goto S. 1995. The action of magnesium in reducing renal calcification in rats receiving high

- phosphorus supplemented diet Nutrition Research, Volume 15, Issue 11, November 1995, Pages 1673-1682.
73. McDonald P, Edwards RA, Greenhalgh J. 1971. "Animal Nutrition," 3rd ed. London: Oliver and Boyd, pp 83–84, 1971.
74. McDowell L.R. 1996. Feeding minerals to cattle on pasture, Animal Feed Science Technology 60 (1996) 247-27 1
75. McDowell, L.R., 1985. Nutrition of Grazing Ruminants in Warm Climates. Academic Press, New York.
76. Metson J. 1978. Seasonal variations in chemical composition of pasture II. Nitrogen, sulphur, and soluble carbohydrate. New Zealand Journal of Agricultural Research. Volume 21, Issue 2, 1978.
77. Minson, D.J. 1990. Magnesium. In: Forage in Ruminant Nutrition. Academic Press, Sydney, pp. 265–290.
78. Monsalve F. 2004. Comparación de dos métodos para estimar la digestibilidad posruminal de la proteína cruda del pasto kikuyo (*Pennisetum clandestinum*). Trabajo de grado de Zootecnia, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia, Medellín. 18 p.
79. Morgan S. 2011. Solubility Rules En: Analytical Chemistry. University of South Carolina. Contenido en línea: <http://www.chem.sc.edu/faculty/morgan/resources/solubility/>
80. Morrison, M., Murray, R.M. and Boniface, A.N. 1990. Nutrient metabolism and rumen microorganisms in sheep fed a poor quality tropical grass hay supplemented with sulphate. Journal of Agricultural Science 115, 269–275.
81. Moseley G y Griffiths D. 1984. The mineral metabolism of sheep fed high and low magnesium selections of Italian ryegrass. Grass Forages science, 39:105.
82. National Library of Medicine - Medical Subject Headings 2006
83. National Research Council (NRC). 2001. The nutrient requirement of dairy cattle. Seventh edition; National Academy Press, Washington D. C. Cap 9, 12, 15, 1.
84. NIST 2011. National Institute of standards and technology. Standard reference database 2011

85. Nocek J E 1988 In situ and other methods to estimate ruminal protein and energy digestibility: a review. *Journal of Dairy Science* 71 (8): 2051 – 2069
86. Nocek, J. E. 1985. Evaluation of specific variables affecting in situ estimates of ruminal dry matter and protein digestion. *J. Anim. Sci.* 60:1347.
87. O'Kelley, R. E., and J. P. Fontenot. 1969. Effects of feeding different magnesium levels o drylot-fed lactating beef cows. *J. Anim. Sci.* 29:994–1000.
88. Ørskov ER, Hovell FD DeB and Mould F. 1980. The use of nylon bag technique for the evaluation of feedstuffs. *Tropical Animal Productivity* 195-213.
89. Ortega M. Carranco M. 1993. Factores que afectan la digestibilidad in situ de 10s alimentos en el rumen. *Vet Mex.* 24 (1) 1993.
90. Panella-Riera N, Velarde A, Dalmau A, E. Fàbrega, M. Font i Furnols, M. Gispert, J. Soler, J. Tibau, M.A. Oliver, M. Gil. 2009. *Livestock Science*, Volume 124, Issues 1–3, September 2009, Pages 277-287.
91. Parsi J, Godio L, Miazzo R, Maffioli R, Echevarria A, Provencal P. 2001. Valoración Nutritiva De Los Alimentos y Formulación De Dietas. Curso de Producción Animal, FAV UNRC. Información en línea: <http://www.produccion-animal.com.ar>
92. Patnaik, Pradyot 2003. *Handbook of Inorganic Chemicals*. New York: McGraw Hill.
93. Peña G, Añez B. Mario D. 2007. Respuesta de la cebolla (*Allium cepa* L.) a la aplicación de azufre, magnesio, cinc y boro en suelos alcalinos. *Revista Forestal Venezolana - Número 043 - Vol 002*.
94. Petersen G, Pedersen C, Lindemann M, Stein H. 2011. Relative bioavailability of phosphorus in inorganic phosphorus sources fed to growing pigs. doi: 10.2527/jas.2009-2161J ANIM SCI vol. 89 no. 2 460-466
95. Pino I. Correa H. Cinética de la liberación ruminal de Fuentes inorgánicas. Datos sin publicar.

96. Quin, J.I., Watli van cler, J.G. and Mybiirgli, S. 1938. Studies on the alimentary tract of Merino sheep in South Africa. 4. Description of experimental technique. Onderstepoort J. vet. Sn. Anim. Znd., 11: 341-360
97. Radostits O, Gay C, Blood D, Hinchcliff K. 2002 Medicina veterinaria, tratado de las enfermedades del ganado bovino, Ovino, Caprino, Procino y Equino. Cap 15.
98. Reference Tables for Physical Setting/Chemistry. 2011 Edition. Kentucky University. Contenido en línea: <http://www.kentchemistry.com/newRT.pdf>
99. Reid, R.L., Jung, G.A. and Gross, C.F., 1976. Grass tetany as a metabolic problem in the eastern United States. Proc. Hill Lands Int. Symp., West Virginia University, Morgantown, WV, pp. 640-648.
100. Reis, R. B., and D. K. Combs. 2000. Effects of increasing levels of grain supplementation on rumen environment and lactation Journal of Dairy Science Vol. 84, No. 2, 2001 performance of dairy cows grazing grass-legume pasture. J. Dairy Sci. 83:2889–2899.
101. Relling A. Mattioli G. 2003. Fisiología digestiva y metabólica de los rumiantes. Actualización. Ohio State University, Facultad de ciencias veterinarias, universidad mar del plata.
102. Roche J, Petch S, Kay J. 2005. Manipulating the Dietary Cation-Anion Difference via Drenching to Early-Lactation Dairy Cows Grazing Pasture Journal of Dairy Science Volume 88, Issue 1, January 2005, Pages 264–276
103. Rotger A. Ferret A. Calsamiglia S. Manteca X. 2006. Effects of nonstructural carbohydrates and protein sources on intake, apparent total tract digestibility, and ruminal metabolism in vivo and in vitro with high-concentrate beef cattle diets. J Anim Sci 2006, 84:1188-1196.
104. Royal Society of chemistry - Chemspider. Contenido en línea: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.22987.html>
105. Rubin A, Terasaki M, Sanui H. 1979. Major intracellular cations and growth control: Correspondence among magnesium content, protein synthesis, and the onset of DNA synthesis in BALB/c3T3 cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. vol. 76 no. 8 p 3917–3921.

106. Russell JB, DB Dombrowski. 1980. Effect of pH on the efficiency of growth by pure cultures of rumen bacteria in continuous culture. *Appl Envir Microbiol* 39, 604-610.
107. Scandolo D, Noro D. Bohmwald H. Contreras P. Wittwer. 2007. Variación diurna del pH y de las concentraciones de magnesio y potasio del fluido ruminal en vacas lecheras a pastoreo. *Arch. Med. Vet.* 39, N° 2, 2007
108. Schaefer D. Wheeler L. Noller C. Keyser R. White J. 1982. Neutralization of Acid in the Rumen by Magnesium Oxide and Magnesium Carbonate. *Journal of Dairy Science* Vol. 65, No. 5, 1982
109. Schonewille J, H. Everts, Jittakhot S, y Beynen A 2007; Quantitative Prediction of Magnesium Absorption in Dairy Cows. *J. Dairy Sci.* 91:271–278
110. Schonewille J, Van't Klooster A, Wouterse H And Beynen A. 1998. Effects of Intrinsic Potassium in Artificially Dried Grass and Supplemental Potassium Bicarbonate on Apparent Magnesium Absorption in Dry Cows. *J Dairy Sci* 82:1824–1830
111. Schonewille J. 2013. Magnesium in dairy cow nutrition: an overview. *Plant and Soil* July 2013, Volume 368, Issue 1-2, pp 167-178
112. Scott, D. 1966. The effects of sodium depletion and potassium supplementation upon electrical potentials in the rumen of the sheep. *Quarterly Journal of Experimental Physiology* 51, 60–69.
113. Tomas E. Potter B. 1976. The site of magnesium absorption from ruminal stomach. 1976. *Br. J. Nutr.* 36: 37-45. 1976
114. Uden P. Van Soest P. 1984. Investigation of the In situ bag technique and a comparison of the fermentation in heifers sheep, ponies and rabbits. *Journal of Animal Science* 58: 213
115. Underwood E. Suttle N. 1999. The mineral nutrition of livestock 3rd edition. CABI International.
116. Valkeners, D., A. The´wis, S. Amant, and Y. Beckers. 2006. Effect of various levels of imbalance between energy and nitrogen release in the rumen on microbial protein synthesis and nitrogen metabolism in growing double-musced Belgian Blue bulls fed a corn silage-based diet. *J. Anim. Sci.* 84:877–885.

117. Van Eys, J. E. and R L. Reid. 1987. Ruminal solubility of nitrogen and minerals from fescue and fescue/red clover haylage. *J. Anim. Sci.* 62:1101.
118. Van Hellen R. Ellis W. 1977. Sample container porosities for rumen in situ studies. *Journal of Animal Science* 44:141.
119. Vanhatalo, A. 1995. Assessment of intestinal feed nitrogen digestibility in ruminants by the mobile-bag method. Dissertation, Agricultural Research Centre of Finland, Institute of Animal Production, 124 pp.
120. Wilde D. 2006. Influence of macro and micro minerals in the periparturient period on fertility in dairy cattle. Alltech House UK <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2006.08.004>.
121. Wittwer F. Contreras P. Klein R. Bohmwald T. 1995. Efecto de la administración oral de óxido de magnesio y sulfato de magnesio en vacas con hipomagnesemia inducida. *Arch. Med. Vet.* XXVII, N°1, 1995.
122. Xin Z, Tucker W, Hemken R. 1989. Effect of Reactivity Rate and Particle Size of Magnesium Oxide on Magnesium Availability, Acid-Base Balance, Mineral Metabolism, and Milking Performance of Dairy Cows. 1989 *J Dairy Sci* 72:462-470

CAPITULO 3.

EVALUACIÓN DE MÉTODOS TÉRMICOS, FÍSICOS Y QUÍMICOS SOBRE LA ACTIVIDAD *In Vitro* DE GAMMA GLUTAMIL TRANSFERASA EN LÍQUIDO RUMINAL BOVINO

Wilmer A Cuervo* Ztc ESp (c)MSc; Hector J Correa**

* Grupo de investigación en nutrición Toxicología y reproducción.

GRUPONTRA, Universidad Cooperativa de Colombia, Bucaramanga Colombia

wilmer.cuervo@campusucc.edu.co

** Departamento de Producción Animal. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín.

3.1 Resumen

Con el objetivo de determinar el efecto de la centrifugación, descongelamiento y la adición de sales de magnesio sobre la actividad de la gamma glutamil transferasa (GGT) en líquido ruminal (LR) de bovinos, se extrajeron 2 muestras de 100ml de LR de vacas holstein fistuladas (620 ± 14 Kg 7 años de edad) que fueron almacenadas en congelación y posteriormente divididas en partes iguales y sometidas a tratamientos secuenciales de descongelación [temperatura ambiente (*LRDC*) o Baño de María (*LRCaI*)], sin y con centrifugación [$10000 \text{ g} \times 10 \text{ min}$ (*LRDC+C* y *LRCaI+C*)] y adición de sal de Mg [MgSO_4 ó MgCl_2 ó sin adición]. Los datos fueron comparados con líquido ruminal fresco (*LRF*) extraído de las mismas vacas. Sobre todas las muestras fue medida la actividad de la GGT mediante un método colorimétrico. Los datos fueron sometidos a dos análisis estadísticos, el primero, un diseño de bloques completos al azar (BCA) con un arreglo factorial $2 \times 2 \times 3$ (donde los factores fueron el tratamiento térmico con dos niveles, el físico con 2 niveles y el químico con tres niveles) y donde cada animal constituyó un bloque. El segundo, un BCA con arreglo factorial 3×3 , donde los factores analizados fueron el tratamiento térmico (*LRDC*, *LRCaI* y *LRF*) y químico (MgSO_4 ó MgCl_2 ó sin adición). La actividad ruminal de la GGT fue afectada negativamente por la centrifugación ($p < 0,0001$). Las muestras de *LRF* con adición de MgCl_2 presentaron significativamente ($p < 0,001$) mayor actividad *In vitro* de la GGT que las muestras del tratamiento control ó con MgSO_4 . La adición de Mg en LR

generó un aumento en la actividad de la GGT ampliamente superior al reportado en la literatura previamente. No hubo un efecto significativo del tratamiento térmico sobre la actividad de la enzima ($p=0,57$). Se concluye que la adición de $MgCl_2$ y no de $MgSO_4$ ($p=0,93$) afecta positivamente la actividad de la enzima GGT *In vitro* al contrario del efecto generado por el tratamiento físico de centrifugación.

Palabras clave: *Aminotransferasas, Ganado lechero, iones divalentes Nitrógeno no proteico, trópico alto*

3.2 Introducción

La técnica *In situ* de la bolsa de Nylon (Ørskov et al 1980), la técnica de gases *In vitro* (Theodorou et al 1994) y el RUSITEC (Cerkawsky y Breckenridge 1977) han sido utilizadas para evaluar el valor nutricional de forrajes y otras materias primas utilizadas en la alimentación animal. En la actualidad se ha resaltado la necesidad de la obtención de LR bovino por medio de técnicas poco invasivas, como las metodología *in vitro*. Las técnicas *in vitro* utilizan liquido ruminal proveniente de uno o mas animales donantes para determinar el comportamiento de determinado alimento en un medio que simula el ambiente ruminal por un corto periodo de tiempo (Giraldo et al 2006, Figuereido et al 2000). Existen varias formas de almacenamiento (Zeigler et al 2003) y procesamiento (Luchini et al 1996) que pueden alterar la composición normal de las poblaciones microbianas, asi como su integridad, metabolismo y actividad enzimática (Hsu y Fahey 1990). Dentro de estos procesos enzimáticos, la fijación de nitrógeno no proteico (NNP) para la síntesis de proteína verdadera (Owens y Zinn 1988, Huntington 1986, Annison y Briden 1999) está mediada por aminotransferasas microbianas entre la que se encuentra la glutamato deshidrogenasa (GDH) y gamma glutamil transferasa (GGT) (Owens y Zinn 1988). La etapa final de esta fijación es mediada por la GDH y utiliza como cofactor al sistema $NADH^+H^+$, produciendo una molécula de glutamato (Pabon 2004). Adicionalmente en este sistema, iones divalentes como Co, Cu y Mg actúan como cofactores (Faixová et al 2006).

En microorganismos, la GGT (2.3.2.2.) participa en la fijación de NNP en forma de amonio (NH_4^+) uniéndolo a una molécula de glutamato para obtener L-glutamina. Esta reacción utiliza al Mg dependiente de ATP como cofactor (Nelson y Cox, 2001).

Teniendo en cuenta los conceptos expuestos anteriormente, el objetivo de la presente investigación fue determinar el efecto ejercido por tratamientos térmicos de descongelación, físicos y la adición de dos fuentes de Mg (MgSO_4 y MgCl_2) sobre la actividad enzimática de la GGT en LR de vacas lecheras.

3.3 Materiales y Métodos

3.3.1 Localización y Animales.

La investigación se realizó en la granja experimental Paysandú de la Universidad Nacional de Colombia, ubicada en el municipio de Santa Elena Antioquia a 2538 msnm y que pertenece a la zona de vida de Bosque húmedo montano bajo (bH – MB) (Holdridge 1996). Se utilizaron tres vacas de la raza Holstein, adultas no lactantes canuladas al rumen, con un peso y edad promedio de 620 ± 14 Kg y 7 años respectivamente. Dichos animales fueron alimentados a voluntad con pasto kikuyo (*Cenchrus clandestinus* (Hoechst Ex Chiov) Morrone) (Chemisquy et al 2010).

3.3.2 Toma muestras

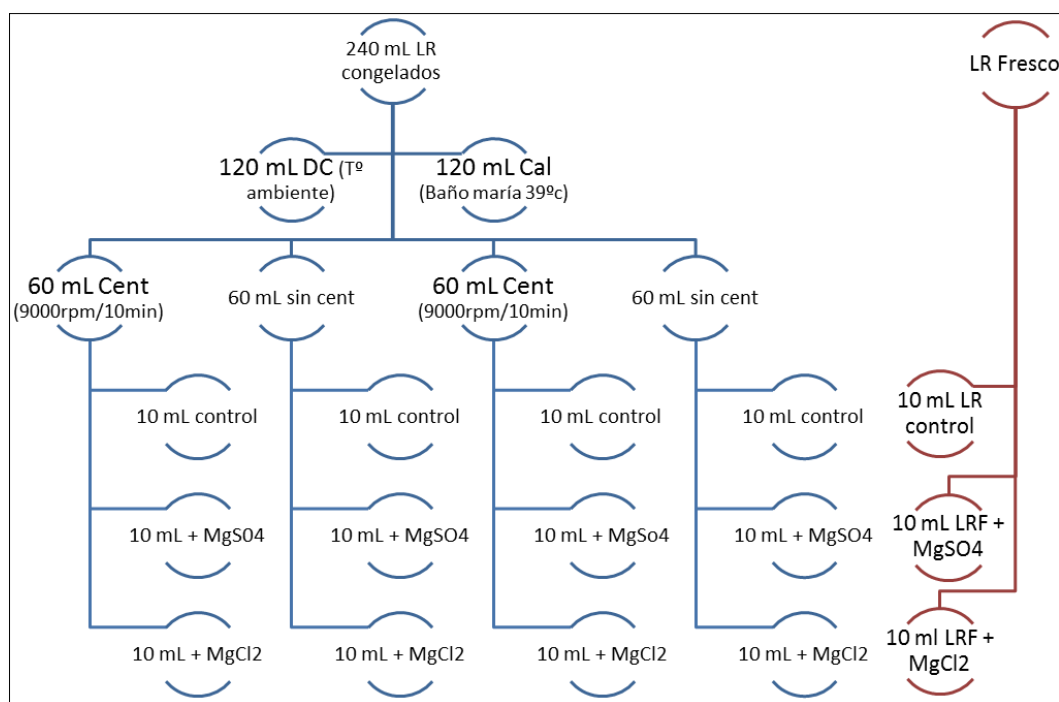
A las 08:00 se tomó una muestra del contenido ruminal de cada animal a través de la cánula; posteriormente el contenido fue exprimido y filtrado a través de cuatro capas de gasa quirúrgica para obtener aproximadamente 240mL de líquido ruminal LR por animal (Seigler et al 2010, Luchini et al 1996, Moharrery y Tirta 2001, Cuervo et al 2011). Con el objetivo de mantener las condiciones de anaerobiosis y temperatura, el LR fue almacenado en un recipiente plástico y transportado al laboratorio de Nutrición Animal de la Universidad Nacional de Colombia dentro de un termo contenedor con agua a 39°C. Posteriormente, las muestras de cada vaca fueron congeladas a -4°C durante 48 horas.

3.3.3 Tratamientos

De la muestra inicial congelada, 60mL fueron descongelados a temperatura ambiente (*LRDC*), mientras que otros 60 mL fueron introducidos en baño de maría (*LRCaI*) a 39°C durante 40 minutos (Seigler et al 2010, Luchini et al 1996). En el momento en que ambas sub-muestras alcanzaron el estado líquido, cada una de ellas fue dividida en dos porciones iguales de 30mL, una porción fue sometida a centrifugación (*LRDC+C*, *LRCaI+C*) a 9000 x g durante 10 minutos, y la otra permaneció intacta.

Del sobrenadante de cada recipiente de las muestras centrifugadas, se extrajeron 3 alícuotas de 10ml cada una (a, b y c), las cuales recibieron adición de $MgCl_2$ y $MgSO_4$, respectivamente, mientras que la última alícuota no recibió mineral. La adición se realizó hasta alcanzar una concentración en el LR de aproximadamente 20×10^{-3} mol/L (Faixhova et al 2006), lo que significó la adición de 24 mg de $MgSO_4$ y 19 mg de $MgCl_2$ a cada tubo con 10ml de LR.

Figura 3.1. Obtención de Sub-muestras de líquido ruminal (LR)



Muestras Control corresponde a 10mL de LR sin adición de Mg

A muestras de líquido ruminal fresco (LRF) también se les analizó la actividad enzimática una hora después de su colecta en campo, sometiendo las alícuotas a las mismas adiciones de las fuentes minerales mencionadas previamente pero sin centrifugar, con el fin de poder contrastar la actividad del LRF con el LR centrifugado (tanto el LRDC como el LRCal) De esta manera, para efectos del análisis y comparación de la actividad enzimática en el LRF, se diseñó un segundo modelo estadístico descrito más adelante.

3.3.4 Medición Actividad Enzimática.

En cada una de las repeticiones de cada tratamiento se determinó la actividad de la GGT por duplicado utilizando el kit colorimétrico 11520 de Biosystems (Costa Brava 30, Barcelona España) en el que la gamma-glutamyl transferasa (GGT) cataliza la transferencia del grupo γ -glutamilo de la γ -glutamyl-3-carboxi-nitroanilida a la glicilglicina, liberando 3-carboxi-4-nitroanilina. El cambio en la absorbancia (405nm) debido a la formación de este último compuesto fue medido cada minuto durante tres minutos y dicho cambio fue utilizado para medir la actividad de la GGT.

Se realizaron lecturas de absorbancia (405 nm) cada minuto por 3 minutos y se determinó la diferencia promedio entre las lecturas (Δ), la cual fue ingresada en la siguiente ecuación:

Ecuación 3.1. Determinación de la actividad enzimática

$$\Delta A / \text{min} \quad x \frac{V_t * 10^6}{\epsilon * I * V_s} = U / L$$

Kit No 11520 Byosystems ®

Dónde:

$\Delta A/\text{min}$ = Diferencia promedio entre lecturas de absorbancia

V_t = volumen total de la reacción (1,1 mL)

ϵ = Coeficiente de absorción molar de 3-carboxy-4nitroanilina a 405nm (9900)

I = el paso de la luz (que corresponde al ancho de la celda 1cm)

V_s = Volumen de la muestra (0,1 mL)

La actividad enzimática fue expresada en nKtal/L de acuerdo a los procedimientos estipulados en el kit comercial.

3.3.5 Análisis Estadístico

Para analizar la información obtenida se utilizaron dos modelos estadísticos.

En el primer modelo estadístico utilizado, la actividad de la GGT en las muestras de LRDC, LRCal, LRDC+C, LRCal + C fueron analizadas bajo un diseño en bloques completos al azar con un arreglo factorial 2x2x3, donde los bloques correspondieron a las vacas donadoras del LR y los factores analizados fueron respectivamente, el tratamiento térmico durante la descongelación del LR (dos niveles), el tratamiento físico (con y sin centrifugación) y la fuente de Mg (sin adición, MgSO₄ y MgCl₂) de acuerdo al siguiente modelo:

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

Donde Y_{ijk} es la actividad de la GGT en el LR; μ es la media poblacional; T_i es el efecto del i -ésimo tratamiento experimental; B_j es el efecto del j -ésimo bloque, y e_{ijk} es el error experimental.

El segundo modelo estadístico se utilizó para comparar la actividad de la GGT en los tratamientos que **no** fueron sometidos a centrifugación, es decir los tratamientos LRDC, LRCal y LRF. Con este objetivo se utilizó un diseño en bloques completos al azar con arreglo factorial 3x3 donde los factores analizados fueron el tratamiento térmico (LRF, LRDC, LRCal) y la adición de Mg (MgSO₄, MgCl₂ y sin adición). Este modelo se representa como:

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

Donde Y_{ijk} es la actividad de la GGT en el LR; μ es la media poblacional; T_i es el efecto del i -ésimo tratamiento experimental; B_j es el efecto del j -ésimo bloque, y e_{ijk} es el error experimental.

Para ambos análisis se utilizó el PROC GLM y el comando LSMEANS del paquete estadístico SAS ® (2002) donde la variable respuesta a analizar fue la actividad enzimática, expresada en nKtal/L (Faixová y Faix 2002).

3.4. Resultados y Discusión.

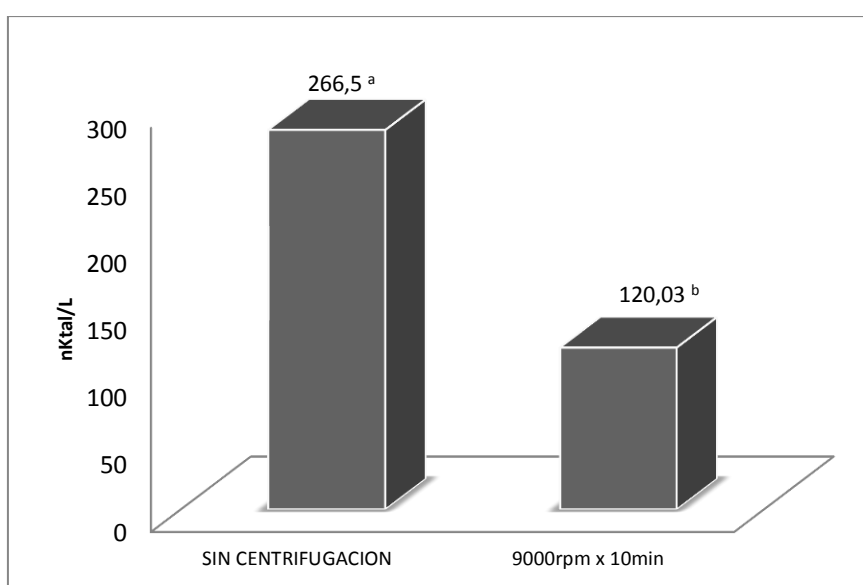
De manera general se observaron cambios importantes causados por los tratamientos físicos, térmicos y químicos sobre la actividad de la GGT en el líquido ruminal (LR), para lo cual resultó útil la comparación con el LR fresco.

3.4.1 Efecto Térmico, físico y químico en LR congelado.

En el primer análisis de BCA (2x2x3) no se detectó interacción significativa de segundo orden ($p=0,42$) ni de primer orden ($p=0,92$) sobre la actividad ruminal de la GGT, pero sí se evidenció efecto de la centrifugación indicando que este tratamiento reduce la actividad de la GGT ($p<0,0001$) (ver Grafica 3.1). Dichos resultados concuerdan con los reportes de Luchini et al (1996) quienes determinaron que velocidades de centrifugación de LR superiores a 5000rpm, disminuyen la actividad normal de las bacterias, relacionando estos cambios con daños físicos sobre los microorganismos ruminales. Hsu y Fahey (1990) por su parte, observaron ligeros efectos de la centrifugación del LR sobre la concentración bacteriana, presentando una reducción del 13% en comparación con el LR fresco. Moharrery y Tirta (2001), de igual forma, observaron una menor actividad enzimática en LR sometido a centrifugación con velocidad de 26000 x g comparado con LR centrifugado a 1000 x g.

Reportes previos de Cheng et al (1977) y Cerkawsky (1979), establecen que la gran mayoría de las bacterias en el rumen se encuentran asociadas con la fracción sólida de la digesta (forraje), lo cual puede explicar el fenómeno observado en el presente estudio y reportados en experimentos previos, teniendo en cuenta que posterior a la centrifugación el sobrenadante utilizado presentaría una menor concentración de microorganismos.

Grafica 3.1. Efecto del tratamiento físico (centrifugación) sobre la actividad enzimática de GGT en el LR.



Medias con letras diferentes son significativamente diferentes
Actividad GGT medida en nKtal/L

Las velocidades de centrifugación reportadas por otros autores varían desde 5000 x g (Luchini et al 1996) hasta 49.000 x g (Wallace y McPherson 1987) siendo utilizadas para reducir la contaminación con desechos y la discriminación de poblaciones microbianas y de protozoos en el LR (Fsu y Fahey 1990). Mayo et al (2000) indicaron que es necesario centrifugar el LR antes de someterlo procesos de liofilización para su conservación.

Por otro lado, los tiempos de centrifugación más utilizados en estudios de poblaciones microbianas y parámetros ruminales, oscilan entre 10 (Chaudhry y Mohamed 2012) y 30 minutos (John y Ulyatt 1984), de tal forma que el tiempo utilizado en el presente experimento se encuentra en este rango.

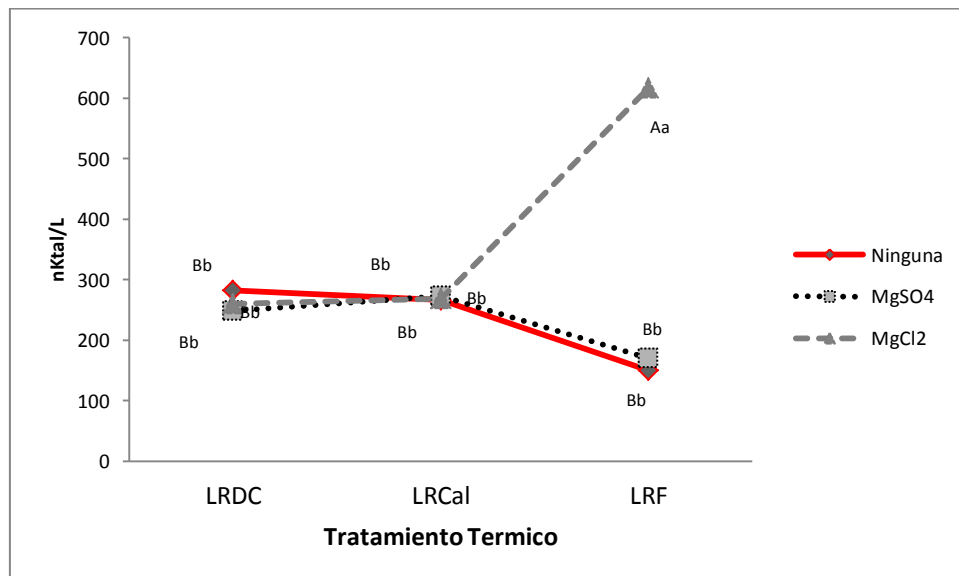
La menor actividad enzimática presentada en las muestras centrifugados puede ser explicada por el efecto físico que genera dicho proceso, esto es la separación de la fase líquida y la sólida, siendo precisamente esta última fracción en donde se encuentra la mayor concentración de bacterias adheridas a las partículas de forraje que luego del proceso quedaría en el sedimento y no en el sobrenadante, fracción de la cual se obtuvieron las muestras de LR para el análisis.

3.4.2. Efecto Térmico y químico sobre LR sin centrifugar.

En el segundo análisis de BCA (3x3) se encontró que el método de descongelación y la adición de las sales de Mg interactuaron de manera significativa sobre la actividad *In vitro* de la GGT ($p > 0,006$) cuyos resultados se observan en la gráfica 3.2.

La interacción observada entre el efecto del tratamiento térmico durante la descongelación y la adición de sal de Mg (Ver Grafica 3.2.) demuestra que LR congelado previamente no respondió a la adición de las sales de Mg, mientras que la actividad de la GGT en el LRF respondió únicamente a la adición de $MgCl_2$.

Grafica 3.2. Interacción entre el tratamiento térmico y la adición de Mg en LR



Literales diferentes en mayúsculas indican diferencias entre tratamientos
 Literales diferentes en minúsculas indican diferencias dentro de la fuente

Este fenómeno puede deberse al efecto que ejerce la congelación sobre las células bacterianas, formando cristales de hielo, lo que pudo permitir que el contenido citoplasmático haya entrado en contacto con el medio ambiente ruminal luego del rompimiento de la estructura celular (Chaudry y Mohamed 2012, Furchtenicht y Broderick 1987). Bajo estas condiciones, el Mg pudo entrar en contacto con los compuestos orgánicos incluyendo otras enzimas (como la alcalina fosfatasa, hexoquinasas y deoxiribonucleasa) (Shils 1997) reduciendo su disponibilidad para actuar como cofactor de la GGT. Lo contrario habría sucedido con la GGT en el LRF, donde las células microbianas se encontraban intactas y el uso de Mg (específicamente del $MgCl_2$) habría estado regulado, permitiendo que éste efectivamente pudiera participar como cofactor de esta enzima.

Otro elemento que podría ayudar a explicar estos resultados, es la diferencia en la fuerza iónica de las dos sales estudiadas. La fuerza iónica indica la magnitud en que están unidos los iones de un compuesto (Skoog y Vest 2002) de tal manera que en compuestos con altas fuerzas iónicas existe menor posibilidad de separación o disociación de sus iones (Hofmeister 1888). Utilizando la ecuación de Lewis y Randall citada por Back et al (1966), la fuerza iónica teórica para el $MgSO_4$, habría sido 0,052 mientras que para el $MgCl_2$ hubiera sido de 0,039. De esta forma, la disociación del Mg contenido en el sulfato habría sido menor a la del Mg contenido en la sal de cloruro, lo que posiblemente habría afectado la disponibilidad de este ion en el LR.

No obstante, que la solubilidad de las dos sales estudiadas es alta, dicha solubilidad solamente aplica en condiciones de agua pura. Bajo condiciones como las del LR, en donde existe una amplia variedad de iones incluso aquellos que hacen parte de las sales estudiadas y con concentraciones muy variables, se altera la solubilidad de la sal, en respuesta a cambios en la fuerza iónica de la solución (Willey 2004). Sin embargo, debido a que no se evaluó la composición de iones en el LR, puesto que no era objetivo de este trabajo, no es posible determinar los efectos positivos o negativos, que ellos hubieren causado sobre las dos sales analizadas, pero es probable que dicho efecto

haya sido negativo en la solubilidad del $MgSO_4$ y positivo en la del $MgCl_2$ y ello hubiese modificado el efecto de dichas sales sobre la GGT.

La GGT posee una ubicación estratégica a nivel celular y específicamente en bacterias se ha detectado de forma intracelular (Suzuki et al 1986), al igual que otras enzimas relacionadas con el metabolismo proteico (Kopečný y Wallace 1982). Se ha establecido que la enzima tiene porciones de aminoácidos presentes en el citoplasma, peri-plasma y exterior de la celular (Nakayama et al 1984, Withfield 2001), las cuales trabajan de manera coordinada en procesos de transaminación. De esta forma, en caso de existir un daño físico de la membrana, como se supone existió en el LRDC y LRCal, es de suponer que la acción de la enzima no fuera igual y no respondiera a estímulos previamente evaluados como la adición de Mg (Faixová y Faix 2002; Faixová et al 2006).

La reducción en la actividad microbiana debido a procesos de congelación y descongelación de LR, fueron reportados por Cecava et al (1990) quien observó disminución en el N presente en el LR descongelado en baño de maria. Merry y McAllan (1983) por su parte, demostraron pérdidas significativas de ARN en LR trabajando con temperaturas de congelamiento idénticas a las del presente estudio. Por el contrario Ha y Kenelly (1984) observaron que la congelación no afectó la relación N: purinas en muestras de LR para el aislamiento de bacterias. Malik (1989) y Arcos et al (2004) coinciden en afirmar que el método más eficiente y confiable de criopreservación para microorganismos anaeróbicos es la congelación a $-20^{\circ}C$ e incluso a $-196^{\circ}C$ en nitrógeno líquido, pero con la adición de criopreservante.

A pesar de estos hallazgos es claro que la congelación de LR requiere la utilización de criopreservantes, de tal forma que Malik (1988) utilizó materiales como leche sin grasa, glutamato, mesoinositol, miel y rafinosa, observando una preservación a largo plazo para más de 160 cepas de 36 especies de bacterias fijadoras de nitrógeno. Posteriormente (1991), el mismo autor recomendó la utilización de agentes crioprotectores como dimetil-sulfoxido (5% p/v) o glicerol (10% p/v), trabajando con una tasa de congelamiento de $1^{\circ}C$ por minuto hasta los $-30^{\circ}C$, con el fin de evitar la formación de cristales de hielo en la membrana.

Los resultados de la presente investigación permiten postular que la actividad de la GGT en LR fresco sin adición de sales de Mg, obtenido de bovinos fistulados (150 nKtal/L) es, en gran medida, inferior al reportado previamente en ovinos (1110 nKtal/L) por Faixová y Faix (2002) y Faixova et al (2006). No obstante, el efecto generado por la adición *In vitro* de MgCl₂ es ampliamente superior (410%) en bovinos al reportado previamente en ovinos por dichos autores. Este contraste de la actividad enzimática puede estar relacionada con las diferencias entre estas dos especies, específicamente con respecto al número y tipo de poblaciones ruminales así como el pH ruminal y la disponibilidad de aminoácidos o péptidos aceptores de la reacción (Thompson y Meister 1976, Allison y Meister 1981, Allison 1985).

Las condiciones óptimas bajo las cuales se lleva a cabo de manera más intensa la reacción que cataliza la GGT incluyen un pH de 8 o superior (Tate y Meister 1974, Thompson y Meister 1976) y temperaturas entre 29 y 30°C (Wickham et al 2011). No obstante el pH ruminal promedio en bovinos es de 6,7 y el de ovinos es de 6,6 (Ver tabla 3.1) por tanto no es de esperarse que las diferencias observadas entre la actividad de la GGT entre estas dos especies estén relacionadas con esta característica.

Por otro lado, el promedio tanto de bacterias como de protozoarios en el contenido ruminal de bovinos es más del doble que el reportado en ovinos, revelando profundas diferencias entre las densidades de las poblaciones ruminales. Se sabe que aproximadamente el 70% de la microbiota ruminal está ligada a la fase sólida del contenido ruminal (Forsberg y Lam 1977) y que este tipo de bacterias es responsable de cerca del 75% de la actividad proteolítica del rumen (Miron et al 2001). Sin embargo en el presente estudio y en los realizados por Faixová y Faix (2002) y Faixová et al (2006) por practicidad en la metodología, se utilizó LR como sustrato para el análisis de la actividad de la GGT y no contenido ruminal.

Teniendo en cuenta que dicho análisis se realizó sobre el LR y no sobre el contenido ruminal, es posible suponer que en ovinos el contenido de

microorganismos en el medio líquido puede ser superior al presente en bovinos o que en dicho medio puede existir una mayor concentración de protozoarios (ver tabla 3.1), toda vez que este tipo de microorganismos presenta (al menos en ovejas) una actividad de transaminasas inmensamente superior a las bacterias (Tsubota y Hoshino 1969).

Tabla 3.1. pH y Poblaciones ruminales en Ovinos y Bovinos.

Bovinos (150nKtal/L)*		
pH Ruminal	Bacterias	Protozoos
<i>Scandolo et al 2007</i> 6,3	<i>Fraga et al 2012</i> 1,5x10 ¹⁰ /mL	<i>Tokoyama y Johnson 1989</i> 1x10 ⁶ /mL
<i>Mojica et al 2009</i> 7,25	<i>Castillo-lopez et al 2013</i> 200 mg PC /g MS	<i>Franzolin y Dehority 2010</i> 1,2-2,6 x 10 ⁶ /mL
<i>Mouriño et al 2001</i> 6,8	<i>Relling y Matioli 2003</i> 1 x 10 ¹⁰ - 10 x 10 ¹⁰ /mL	<i>Castillo et al 2013</i> 50 mg PC /g MS
<i>Weimer 1996</i> 6,6	<i>Rosales et al 1989</i> 0,16 – 0,21 x 10 ¹⁰ /mL	<i>Rosales et al 1989</i> 0,13 – 0,19 x 10 ⁶ /mL
Ovinos (1110nKtal/L)*		
pH Ruminal	Bacterias	Protozoos
<i>Vargas et al 1992</i> 6,7	<i>Kurihara et al 1968</i> 4,7-5,8 x 10 ¹⁰ mL	<i>Saro et al 2012</i> 0,51x10 ⁶ /mL
<i>Vargas et al 1993</i> 7,05	<i>Grudsky et al 1995</i> 1x10 ⁹ -1,8x10 ¹⁰ / mL	<i>Shu y Liu 1995</i> 8,8x10 ⁴ - 1,2x10 ⁶ /mL
<i>Bispo et al 2007</i> 6,4	<i>Grubb y dehority 1975</i> 30 x 10 ⁶ Colonias/g	<i>Kurihara et al 1968</i> 1-3,3 x 10 ⁶ mL
<i>Carro et al 1999</i> 6,25	<i>Van Lier y Regueiro</i> 1 x 10 ¹⁰ - 10 x 10 ¹⁰ /mL	<i>Van Lier y Regueiro</i> 0,1 x 10 ⁶ - 1 x 10 ⁶ /mL

* Actividad In vitro de GGT en liquido ruminal

Otra razón por la cual podría haberse encontrado una menor actividad de la GGT en este trabajo, es el hecho de que el manejo alimenticio de los animales donantes, fue inferior al utilizado por Faixova y Faix 2002, ya que mientras los animales experimentales de dichos estudios recibieron durante 40 días una dieta con 1,5 Mcal/d de ENI y 12% de PC. En el presente estudio, los valores de energía reportados para esta estación experimental en el forraje consumido por las vacas fistuladas (Kikuyo) son menores (1,15 Mcal/kg ENI) (Correa et al 2011). Este panorama podría haber favorecido el crecimiento microbiano en el caso de los ovinos de los experimentos de Faixová y faix (2002) contrario a lo que podría haber sucedido con las vacas donadoras del presente experimento.

No obstante, debido a que en el presente estudio, la evaluación de tratamientos térmicos y físicos sobre la actividad enzimática de LR fue estática y no dinámica, no se buscó mantener las condiciones anteriormente discutidas.

3.5. Conclusiones

Los resultados de este estudio indican que sin importar el método de descongelación del LR, el tratamiento físico de centrifugación a 10000 x g durante 10 minutos disminuye la actividad enzimática de la GGT, posiblemente relacionado con la ubicación de esta enzima en la membrana celular de los microorganismos ruminales, que en su mayoría se localizan en la fase sólida del contenido ruminal adheridas a partículas fibrosas de la dieta.

La adición de Mg como $MgCl_2$ (pero no como $MgSO_4$) incrementó la actividad de la GGT únicamente en LRF sin que se viera afectada la actividad de esta enzima en las muestras de LR congeladas previamente. Este efecto puede estar relacionado con el efecto físico de cristalización de la membrana bacteriana (y por tanto su rompimiento) generado por la congelación reportado en estudios previos, mismo efecto que alteraría la ubicación y por tanto la función de la GGT. Este cambio físico en la membrana no permitiría la acción del Mg sobre la enzima.

Esto sugeriría que la suplementación de $MgCl_2$ en rumiantes, adicional a su efecto preventivo en la hipomagnesemia, puede ser potencialmente utilizada para mejorar los procesos de transaminación relacionados con la fijación de NNP por parte de los microorganismos ruminales por medio del aumento de la actividad de una enzima clave en este proceso, la GGT.

Se observó una actividad de la GGT en LR significativamente inferior con respecto a la reportada previamente en ovinos, sin embargo la adición *in vitro*

de MgCl_2 al LR generó un aumento más marcado de la actividad enzimática en bovinos.

Se postula que la diferencia exhibida entre las dos fuentes de Mg puede estar relacionada con las diferencias en su solubilidad en medio líquido, siendo seis veces más alta en el MgCl_2 que en el MgSO_4 . No obstante que las dos fuentes presentan un contenido similar de Mg. La fuerza iónica de las dos fuentes también pudo estar asociada con su solubilidad y disociación en el ambiente ruminal y por lo tanto en el efecto generado sobre la actividad de la GGT.

Los resultados encontrados en este experimento permiten concluir que LR congelado sin criopreservación no presenta las condiciones ideales para el estudio del efecto de minerales sobre la actividad enzimática en rumen, por lo que se recomienda trabajar con LR fresco o utilizar metodologías sugeridas que no alteren la composición o estructura de las bacterias ruminales, como la utilización de glicerol, dimetil-sulfoxido (criopreservantes) o la congelación del LR en N líquido.

Se demuestra que el Mg adicionado en forma de MgCl_2 ejerce efectos sobre enzimas relacionadas con el metabolismo nitrogenado del rumen que normalmente no han sido considerados al momento de formulación de raciones para rumiantes. Esto significa por tanto, que es necesario considerar la búsqueda de la eficiencia no solo del comportamiento zootécnico y sanitario del animal, sino además de la optimización del funcionamiento de las poblaciones microbianas en el rumen.

Se confirma de igual forma el carácter ubicuo de las aminotransferasas, especialmente de la GGT, explicado en parte por su ubicación estratégica en la membrana plasmática de células animales, lo que permite al menos postular que esta enzima puede ser producida por microorganismos ruminales.

A pesar del significativo cambio en la actividad ruminal de la GGT observado en el presente estudio, al igual que en otros trabajos que utilizaron técnicas in

vitro e in situ, existieron ciertas condiciones propias del rumen que no se lograron simular, como el movimiento y las contracciones ruminales, el intercambio de nutrientes y gases que pueden alterar el número y actividad de las poblaciones microbianas condicionando su actividad enzimática. Por tanto para tener una idea completa entre la relación del Mg y la actividad de la GGT es necesario evaluar esta interacción por medio de prueba *In situ* e *In vivo*.

Solo en la medida en que se avance en el conocimiento del papel que cumplen estructuras enzimáticas como la GGT y cofactores como el Mg y otros en el metabolismo ruminal, se podrá tener mayor claridad y certeza al incorporar materiales como las sales puras de Mg en la formulación de planes de alimentación que consideren el animal y el rumen como un conjunto completo y complejo.

El presente estudio pone de manifiesto la necesidad de un análisis más profundo sobre las fuentes inorgánicas de minerales para evaluar los efectos que estas tienen a nivel *In situ* e *In vivo*, sobre la actividad de enzimas microbianas que afecten su metabolismo.

3.6. Recomendaciones

Debido a la sencillez y corta duración de la técnica utilizada en el presente estudio, se recomienda realizar este tipo de investigación midiendo múltiples transaminasas relacionadas con el metabolismo ruminal del N, como la glutamato deshidrogenasa, la aspartato amino transferasa y la alanino amino transferasa.

Al igual que el estudio enzimático, sería de gran importancia que experimentos como éste midan el número y tipo de las principales poblaciones bacterianas y de protozoos presentes en el medio ruminal antes, durante y después de la adición de sales de Mg.

Debido a que no existe literatura o reportes previos concluyentes que afirmen que el Mg actúa directamente sobre la reacción catalizada por la GGT u otras

aminotransferasas, se recomienda que se lleven a cabo estudios químicos sobre la naturaleza de esta reacción en el líquido ruminal de bovinos.

Estudios que permitan establecer la solubilidad y disociación de fuentes inorgánicas de minerales bajo las condiciones físico-químicas encontradas en en LR permitirían entender de mejor forma la dinámica entre dichas fuentes, la actividad y el metabolismo microbiano.

De igual forma, es pertinente recomendar el planteamiento de estudios que utilicen técnicas moleculares como la expresión génica, detección y cuantificación de proteína bacteriana (técnica western blot). Es posible que con la inclusión de este tipo de técnicas se pueda tener mayor certeza acerca del efecto de minerales aislados sobre una enzima específica de interés metabólico.

Abstract

Evaluation of thermal, physical and chemical treatments on the gamma-glutamyl transferase in bovine ruminal liquor

In order to determine the effect of centrifugation, thawing and addition of magnesium salts on the activity in rumen fluid (RL) of gamma glutamyl transferase (GGT), 2 samples (100mL each) of RL were extracted from mature, fistulated Holstein cows LR (620 ± 14Kg 7 years old). Samples were stored frozen and then divided equally and subjected to sequential treatments of thawing [room temperature (*LRDC*) or water bath (*LRCaI*)], centrifugation [10000 g x 10 min (*LRDC+C* and *LRCaI+C*)] addition of salt and Mg [*MgSO₄* or *MgCl₂*], the data were compared with fresh rumen fluid (*FRL*) extracted from the very same cows. On all samples the activity of gamma glutamyl transferase (GGT) was measured by the colorimetric method using a spectrophotometric kit (Biosystems ®). Means of treatments were compared using a t test, which revealed that samples of LR with the addition of *MgCl₂* had significantly ($p < 0.01$) greater *In vitro* activity than samples from the control or treatment with

MgSO₄. Additionally a decrease in enzyme activity was observed when the samples were centrifuged compared to other treatments. We conclude that the Mg⁺⁺ affects positively the GGT enzyme activity in vitro in contrast to the effect generated by the physical treatment of spin, but both generated heat treatments increased the enzyme activity showed no significant differences with respect to fresh rumen fluid.

Keywords: *Aminotransferases, Divalent Ions, Dairy Cattle, Non protein Nitrogen, Tropical High*

Bibliografía citada.

1. Allen, V. G. and J. P. Fontenot. 1984. Influence of aluminum as sulfate, chloride and citrate (m magnesium and calcium metabolism in shccp. J, Anita. Sci. 59:798.
2. Allison M. 1969. Biosynthesis of Amino Acids by Ruminant Microorganisms. J Anim Sci 1969, 29:797-807.
3. Allison RD, Meister A. 1981. Evidence that transpeptidation is a significant function of gamma-glutamyl transpeptidase. J Biol Chem. 1981; 256:2988–2992. [PubMed: 6110666]
4. Allison RD. 1985. Gamma-Glutamyl transpeptidase: kinetics and mechanism. Methods Enzymol. 1985; 113:419–437. [PubMed: 2868391]
5. Ankom Technology. 2004. Procedures for fiber and in vitro analysis. URL: [hpt://www.ankom.com/homepage.html](http://www.ankom.com/homepage.html).
6. Annison E. Briden W. 1999. Perspectives on ruminant nutrition and metabolism. II. Metabolism in ruminant tissues. Nutrition Research Reviews (1999), 12, 147±177 147
7. ARC 1980. The Nutrient Requirements of Ruminant Livestock. Commonwealth Agricultural Bureaux, Farnham Royal, Slough, UK, pp. 201–211.
8. Back W. Cherry R. Hanshaw B. 1966. chemical equilibrium between water and minerals of a carbonate aquifer. Nat. Speleol. Soc. Bull. 28 (3); 119-126

9. Beleta J, Gella FJ. 1990. Metodo recomendado para la determinacion en rutina de la concentracion catalitica de la γ -glutamyltransferasa en suero sanguíneo humano. *Quim Clin* 1990; 9:58-61
10. Bender D, Mayes P. 2003 *Vitamins & Minerals*. In *Harper's Illustrated Biochemistry*. Cap 45 p489
11. Bhatia S. Pradhan K. and Singh R. 1978. Microbial Transaminase Activities and Their Relationship with Bovine Rumen Metabolites. 1979 *J Dairy Sci* 62:441-446
12. Bispo S. Ferreira M. Vêras A. Viera A. Silva R. Pimentel M. 2007. Palma forrageira em substituição ao feno de capim-elefante. Efeito sobre consumo, digestibilidade e características de fermentação ruminal em ovinos . *R. Bras. Zootec.*, v.36, n.6, p.1902-1909, 2007
13. Black CB, Cowan JA. 1997. Inert chromium and cobalt complexes as probes of magnesium-dependent enzymes. Evaluation of the mechanistic role of the essential metal cofactor in *Escherichia coli* exonuclease III. *Eur J Biochem* 243, 684–689.
14. Blattner, F. Bloch G. Perna C. Burland N. Riley V. 1997. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* 277: 1453–1462.
15. Braga P. Mannarino S. Eleutherio E. 2009. Glutathione and gamma-glutamyl transferases are involved in the formation of cadmium–glutathione complex. *FEBS Letters*, Volume 583, Issue 9, 6 May 2009, Pages 1489–1492. <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2009.03.066>
16. Carro M. López S. González J. Valdés C. Bochi-Brum O. 1999. Digestibilidad in vitro de forrajes y concentrados efecto de la ración de los animales donantes de líquido ruminal. *Archivos de zootecnia*, ISSN 0004-0592, Vol. 48, Nº 181, 1999 , págs. 51-61
17. Castillo-Lopez E. Kononoff P and Miner J. 2013. The impact of DDGS on presence of ruminal bacteria, ruminal protozoa and yeast during in vitro fermentation. University of Nebraska – Lincoln USA. <http://freepdfdb.com/pdf/the-impact-of-ddgs-on-presence-of-ruminal-bacteria-ruminal-66487427.html>
18. Ceballos A. Noguera R, Bolívar D. Posada S. 2008. Comparación de las técnicas in situ de los sacos de nylon e in vitro (DaisyII) para estimar la

- cinética de degradación de alimentos para rumiantes. *Livestock Research for Rural Development* 20 (7)
19. Cecava M, Merchen N, Gay L, Berger L. 1990. Composition of Ruminant Bacteria Harvested from Steers as Influenced by Dietary Energy Level, Feeding Frequency, and Isolation Techniques. *J. Dairy Sci* 73:2480-2488
 20. Chalupa, W., J. Clark, P. Opliger, and R. Lavker. 1970. Ammonia metabolism in rumen bacteria and mucosa from sheep fed soy protein or urea. *J. Nutr.* 100:161.
 21. Chaudry A. Mohamed R. 2012. Fresh or frozen rumen contents from slaughtered cattle to estimate in vitro degradation of two contrasting feeds. *Czech J. Anim. Sci.*, 57, 2012 (6): 265–273.
 22. Chemisquy, M. A. et al. 2010. Phylogenetic studies favour the unification of *Pennisetum*, *Cenchrus* and *Odontelytrum* (Poaceae): a combined nuclear, plastid and morphological analysis, and nomenclatural combinations in *Cenchrus*. *Ann. Bot. (Oxford)* 106:107–130
 23. Church. D. 1989. E.El rumiante, fisiología digestiva y nutrición. Ed Acribia 1989.p, cap. 8; 168-172, Cap. 3; 283
 24. Clark J. Klusmeyer H. Cameron M. 1992. Microbial Protein Synthesis and Flows of Nitrogen Fractions to the Duodenum of Dairy Cows. En: Symposium: Nitrogen Metabolism And Amino Acid Nutrition In Dairy Cattle. 1992 *J Dairy Sci* 75:2304-2323
 25. Conn. E. Stumpf P. Bruening G 2000. , *Bioquímica Fundamental*, Cap 6; 138-139. Doi R. 5ta edición 2000
 26. Correa C H J, M L Pabón R, Sánchez de G M Y y J E Carulla F 2011. Efecto del nivel de suplementación sobre el balance y eficiencia en el uso del nitrógeno en vacas Holstein de primero y segundo tercio de lactancia bajo condiciones de pastoreo en el trópico alto de Antioquia. *Livestock Research for Rural Development* 23.
 27. Correa H. Rojas H. Ceron J. Pabon M. Carulla J. 2011. MUN: herramienta para mejorar el contenido de proteína en la leche. VII seminario Competitividad en carne y leche, Cooperativa Colanta.
 28. Cowan JA. 1993. Metallobiochemistry of RNA. $\text{Co}(\text{NH}_3)_3^{3+}$ as a probe for $\text{Mg}^{2+}(\text{aq})$ binding sites. *J Inorg Biochem* 49, 171–175.

29. Cowan JA. 1998 Metal activation of enzymes in nucleic acid biochemistry. *Chem Rev* 98, 1067–1087.
30. Cruz R, Hernández, Calva L, Guerrero M, Pérez C, Ramírez, Bribiesca E. 2002. Fisiología Digestiva En Corderos Alimentados Con Dietas Altas En Energía Y Dos Concentraciones De Selenio Y Magnesio; En XXIX Congreso nacional de Buiatria- Mexico.
31. Cuervo W. Orrego C. Correa H.J. 2011. Determinación de la actividad in situ de gama glutamil transferasa (GGT) bajo el efecto de infusión ruminal de magnesio. 2011. *Revista Colombiana Ciencias Pecuarias* 2011; 24:3
32. Czerkawski J and Breckenridge G. 1977. Design and development of a long-term rumen simulation technique (Rusitec) *Br. J. Nutr.* (1977). 38, 371
33. Daryl K, Granner M. 2003 The Diversity of the Endocrine System. In *Harper's Illustrated Biochemistry*. Cap 42 p441
34. Ding Y. Zhang G. Wu H. Hai B. Wang L. Qian Y. 2001. Nanoscale Magnesium Hydroxide and Magnesium Oxide Powders: Control over Size, Shape, and Structure via Hydrothermal Synthesis. January 12, 2001 Copyright © 2001 American Chemical Society
35. Douglas G, Overton T, Bateman H, Dan H, Drackley J. 2006. Prepartal Plane of Nutrition, Regardless of Dietary Energy Source, Affects Periparturient Metabolism and Dry Matter Intake in Holstein Cows. *J. Dairy Sci.* 89:2141–2157
36. Ebel, H. and Günther, T. 1980. Magnesium metabolism: a review. *Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry* 18, 257–270.
37. Faixová zita, faix S. 2002. Influence of Metal Ions on Ruminal Enzyme Activities. *Acta veterinaria (beograd)*, V71 (1), 451-455
38. Faixová zita, Faix S. Makova Z. Vaczi P. Prosboba M. 2006. effect of divalent ions on ruminal enzyme activities in sheep. *Acta veterinaria (beograd)*, V56(1), 17-23
39. Fiems, L. O., B. G. Cottyn, Ch. V. Boucque', J. M. Vanacker, and S. De Campeneere. 1999a. Effect of different degraded protein balances (OEB) on the performance of beef bulls and on digestibility and rumen fermentation in sheep. *Neth. J. Agric. Sci.* 47:17–28.

40. Fishwick, G. 1978. Utilisation of the phosphorus and magnesium in some calcium and magnesium phosphates by growing sheep. *New Zealand Journal of Agricultural Research* 21, 571–575.
41. Forsberg CW, Lam K. 1977. Use of the adenosine 5'-triphosphate as an indicator of the microbiota biomass in rumen contents. *Appl Environ Microb* 33:528-537.
42. Fraga M, Perelmuter K, Valencia M J, Cajarville C, Zunino P. 2012. Caracterización de la microbiota bacteriana ruminal de un bovino a pastoreo mediante técnicas clásicas e independientes del cultivo. *VETERINARIA (Montevideo)* - Vol. 49 - # 189 - Año 2013 - P. 40 a 55
43. Franzolin R. Dehority B. 2010. The role of pH on the survival of rumen protozoa in steers. *R. Bras. Zootec.* V39 N10. P 2262.
44. Furchtenicht J.E., Broderick G.A. 1987. Effect of inoculum preparation and dietary energy on microbial numbers and rumen protein degradation activity. *Journal of Dairy Science*, 70, 1404–1410
45. Furchtenicht J.E., Broderick G.A. 1987. Effect of inoculum preparation and dietary energy on microbial numbers and rumen protein degradation activity. *Journal. of Dairy Science*, 70, 1404–1410.
46. Giraldo L.A. Gutierrez L. Rúa C. 2007. Comparación de dos técnicas in vitro e in situ para estimar la digestibilidad verdadera en varios forrajes tropicales. *Rev Col Cienc Pec* 2007; 20:269-279
47. Goering M, Van Soest PJ. 1979. Forage fiber analysis (apparatus, reagents, procedures and some applications). Washington. USA. 1979. *Agricultural Handbook N° 379*
48. Gojon H, Siqueiros D, Contreras H. 1998. Digestibilidad ruminal y degradabilidad in situ de *Macrocystis pyrifera* y *Sargassum* spp. en ganado bovino. *Ciencias Marinas*, vol. 24, núm. 4, diciembre, 1998, pp. 463-481, Universidad Autónoma de Baja California México
49. Grubb J. y Dehority B. 1975. Effects of an Abrupt Change in Ration from All Roughage to High Concentrate upon Rumen Microbial Numbers in Sheep. *Appl. Microbiol.* 1975, 30(3):404.
50. Grudsky R. Arias J. 1995. Aspectos generales de la microbiología del rumen. Monografía de pregrado. Universidad de Chile. <http://www.produccion->

- animal.com.ar/informacion_tecnica/manejo_del_alimento/12-microbiologia.pdf
51. Ha, J. K., and J. J. Kennelly. 1984. Influence of freeze storage on nucleic acid concentrations in bacterial and duodenal digesta. *Can. J. Anim. Sci.* 64:791.
 52. Harris, B., Jr., H. H. Van Horn, K. E. Manookian, S. P. Marshall, M. J. Taylor, and C. J. Wilcox. 1983. Sugar-cane silage, sodium hydroxide and steam pressure-treated sugarcane bagasse, corn silage, cotton seed hulls, sodium bicarbonate and aspergillus oryzae product in complete rations for lactating cows. *J. Dairy Sci.* 66:1474.
 53. Henry, P.R. and Benz, S.A. 1995. Magnesium bioavailability. In: Ammerman, C.B., Baker, D.H. and Lewis, A.J. (eds) *Bioavailability of Nutrients for Animals*. Academic Press, New York, pp. 239–256.
 54. Henry, P.R. and Benz, S.A. 1995. Magnesium bioavailability. In: Ammerman, C.B., Baker, D.H. and Lewis, A.J. (eds). *Bioavailability of Nutrients for Animals*. Academic Press, New York, pp. 239–256.
 55. Hofmeister F. 1880. *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.* 24, (1888) 247-260.
 56. Hristov A.N., McAllister T.A., Xu Z., Newbold J.C. 2002. Proteolytic activity in ruminal fluid from cattle fed two levels of barley grain: a comparison of three methods of determination. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82, 1886–1893.
 57. Hsu JT, Fahey J. 1990. Effects of Centrifugation Speed and Freezing on Composition of Ruminal Bacterial Samples Collected from Defaunated Sheep. 1990. *Journal of Dairy Science*. Volume 73, Issue 1, January 1990, Pages 149–152
 58. Hsu J, Fahey G 1990. Effects of Centrifugation Speed and Freezing on Composition of Ruminal Bacterial Samples Collected from Defaunated Sheep Original Research Article. *Journal of Dairy Science*, Volume 73, Issue 1, January 1990, Pages 149-152
 59. Huntington, G. B. 1986. Uptake and transport of nonprotein nitrogen by the ruminant gut. 1986. *Fed. Proc.* 45: 2272-2276.
 60. Hutjens M. 1991. *Feed Additives: Which, When, and Why*. livestocktrail.illinois.edu

61. IFFC 1983. methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. Part 4. IFCC method for γ -glutamyltransferase. *J Clin Chem Biochem* 1983;21:633-646.
62. Ikeda Y. Taniguchi N. 2005. gamma-Glutamyl transpeptidase: catalytic mechanism and gene expression. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 1998; 72: 239–78.
63. J. B. Whitfield. 2001. Gamma Glutamyl Transferase. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 38(4):263–355 (2001) 1040-8363/01/\$.50
64. John, A., and M. 1. Ulyatt. 1984. Measurement of protozoa, using phosphatidyl choline, and of bacteria, using nucleic acids, in the duodenal digesta of sheep fed chaffed lucerne hay (*Medicago Sativa* L.) diets. *J. Agric. Sci. (Camb.)* 102:33.
65. Johnson R. 1966. Techniques and Procedures for In Vitro and In Vivo Rumen studies. *J ANIM SCI* 1966, 25:855-875.
66. Kehres D and Maguire M. 2002. Structure, properties and regulation of magnesium transport proteins. *BioMetals* 15: 261–270, 2002
67. Keillor. J. Castonguay R. Lherbet C. 2005. Gamma glutamyl transferase. *Meth. Enzymol.* 401. 2005. 449–467.
68. Kemp, A. and Todd, J.R. 1970. Prevention of hypomagnesaemia in cows: the use of magnesium alloy bullets. *Veterinary Record* 86, 463–464
69. Klusmeyer, T. H., and J. H. Clark. 1991. Effects of dietary fat and protein on fatty acid flow to the duodenum and in milk produced by dairy cows. *J. Dairy Sci.* 74:3055
70. Kohn R. A., Dinneen M. M. and Russek-Cohen E. 2005. Using blood urea nitrogen to predict nitrogen excretion and efficiency of nitrogen utilization in cattle, sheep, goats, horses, pigs, and rats. *J. Anim. Sci.* 83:879–889
71. Kopečný J. Wallace J. 1982. Cellular Location and Some Properties of Proteolytic Enzymes of Rumen Bacteria. *Applied And Environmental Microbiology*, May 1982, Vol 43 No 5. p. 1026-1033
72. Kramer S y Hoffmann L. 1997. In *Clinical biochemistry of domestic animal*, 5th ed. San Diego. Academic Press Inc. 1997. 780p.

73. Kurihara Y, Eadie J, Hobson P, Mann S. 1968. Relationship between bacteria and ciliate protozoa in the rumen sheep. *J. Gen. Microbiol.* (1968) 51, 267 – 288.
74. Lee, S.R. and Britton, W.M. (1987) Magnesium-induced catharsis in chicks. *Journal of Nutrition* 117, 1907–1912.
75. Luchini N, Broderick and Combs D. 1996. Preservation of ruminal microorganisms for in vitro determination of ruminal protein. 1996. *J ANIM SCI* 1996, 74:1134-1143
76. Malik K. 1988. A new freeze-drying method for the preservation of nitrogen-fixing and other fragile bacteria *Journal of Microbiological Methods*, Volume 8, Issue 5, September 1988, Pages 259–271.
77. Malik K. 1991. Cryopreservation of bacteria with special reference to anaerobes. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* November 1991, Volume 7, Issue 6, pp 629-632.
78. Martens, H., Kubel, O.W., Gabel, G. and Honig, H. 1987 Effects of low sodium intake on magnesium metabolism of sheep. *Journal of Agricultural Science, Cambridge* 108, 237–243.
79. Martens, H., Kubel, O.W., Gabel, G. and Honig, H. 1987. Effects of low sodium intake on magnesium metabolism of sheep. *Journal of Agricultural Science, Cambridge* 108, 237–243.
80. Martin MN, Slovin JP. 2000. Purified gamma-glutamyl transpeptidases from tomato exhibit high affinity for glutathione and glutathione S-conjugates. *Plant Physiol* 2000; 122: 1417–26.
81. Mayo M, Sanchez M, Hernandez F, Rivas M. 2000. Evaluación de diferentes métodos de conservación del líquido ruminal para pruebas in vitro. 2000. *Nutrición y alimentación xxv: comunicación 9*
82. Meister A, Tate S, Ross. 1976. Membrane-Bound γ -Glutamyl Transpeptidase. *The enzymes of biological membranes*. Plenum Press. New York. 1976
83. Merry, R. J., and A. B. McAllan. 1983. A comparison of the chemical composition of mixed bacteria harvested from the liquid and solid fraction of rumen digesta. *Br. J. Nutr.* 50:701.
84. Miron J, Ben-Ghedalia D, Morrison M. 2001. Invited Review: Adhesion mechanisms of rumen cellulolytic bacteria. *J Dairy Sci* 84:1294-1309

85. Moharrery A, Tirta K. 2001. Correlation between microbial enzyme activities in the rumen fluid of sheep under different treatments. 2001. *Reprod. Nutr. Dev.* 41 (2001) 513–529
86. Mojica J. Castro E. León J. Cárdenas E. Pabón M. Carulla J. 2009. Efecto de la oferta de pasto kikuyo (*Pennisetum clandestinum*) sobre la producción y calidad composicional de la leche bovina. *Livestock Research for Rural Development* 21 (01) 2009
87. Monsalve F. 2004. Comparación de dos métodos para estimar la digestibilidad posruminal de la proteína cruda del pasto kikuyo (*Pennisetum clandestinum*). Trabajo de grado de Zootecnia, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia, Medellín. 18 p.
88. Mouriño F. Akkarawongsa R. and Weimer P. 2001. Initial pH as a Determinant of Cellulose Digestion Rate by Mixed Ruminal Microorganisms In Vitro. *J. Dairy Sci.* 84:848–859.
89. Nakayama R. Kumagai H. Tochikura T. 1984. γ -Glutamyltranspeptidase from *Proteus mirabilis*: Localization and Activation by Phospholipids. *Journal Of Bacteriology*, Dec. 1984, p. 1031-1036 Vol. 160, No. 3
90. National Library of Medicine - Medical Subject Headings 2006
91. Nelson D, Cox M. 2001. *Lehninger Principles of Biochemistry*. cap 18;657-659.
92. NRC. National Research Council 2001 Nutrients requeriments of dairy cattle; Seven Revised edition, Cap 9, 12, 15, 1.
93. Ørskov E, DeB Hovell and Mould F. 1980. The Use Of The Nylon Bag Technique For The Evaluation Of Feedstuffs. *Trop Anim Prod* 1980 5:3
94. Ortega M. Carranco M. 1993. Factores que afectan la digestibilidad in situ de 10s alimentos en el rumen. *Vet Mex.* 24 (1) 1993.
95. Osuji G 1981. The disintegration of yam tuber gamma-glutamyl transpeptidase during tuber storage. *Acta Biol Med Ger* 1981; 40: 1497–501.
96. Owen F. y Goetsch A. 1989. Fermentación Ruminal. Cap 8 EN *El Rumiante Fisiología Digestiva y Nutricion de Church D.* 1989. Ed Acribia.

97. Owens F. Zinn R. 1989. Metabolismo de la Proteína en los Rumiantes EN Church D El rumiante fisiología digestiva y nutrición. 1989. Ed Acribia. Cap 12.
98. Pabón M. 2004. Notas de clase Bioquímica Ruminal. 2004. ISBN: 958-701-464-2.
99. Petersen G, Pedersen C, Lindemann M, Stein H. 2011. Relative bioavailability of phosphorus in inorganic phosphorus sources fed to growing pigs. doi: 10.2527/jas.2009-2161J ANIM SCI vol. 89 no. 2 460-466
100. Posada S. Noguera. R. 2005. Técnica in vitro de producción de gases: Una herramienta para la evaluación de alimentos para rumiantes. 2005 Livestock Research for Rural Development 17 (4)
101. Powley, G., Care, A.D. and Johnson, C.L. 1977. Comparison of daily endogenous faecal magnesium excretion from sheep eating grass with high sodium or high potassium concentrations. Research in Veterinary Science 23, 43–46.
102. Quin, J.I., Watli van cler, J.G. and Mybiirgli, S. 1938. Stiidies on the alimentary tract of Merino sheep in South Africa. 4. Description of expei imental tecniqrie. Onderstepoort J. vet. Sn. Anim. Znd., 11: 341-360
103. Relling A. Mattioli G. 2003. Fisiología digestiva y metabólica de los rumiantes. Actualización. Ohio State University, Facultad de ciencias veterinarias, universidad mar del plata.
104. Reynolds C. Maltby S. 1994. Regulation of Nutrient Partitioning by Visceral Tissues in Ruminants. American Institute of Nutrition. 0022-3166/94
105. Reynolds C. Maltby S. 1994. Regulation of Nutrient Partitioning by Visceral Tissues in Ruminants. American Institute of Nutrition. 0022-3166/94
106. Rosales M. Laredo M. Cuesta A. Anzola H. Hernández L. 1989. Uso de árboles forrajeros para el control de protozoarios ruminales. Livestock Research for Rural Development Volume 1, Number 1, November 1989.
107. Roche J, Petch S, Kay J. 2005. Manipulating the Dietary Cation-Anion Difference via Drenching to Early-Lactation Dairy Cows Grazing

Pasture Journal of Dairy Science Volume 88, Issue 1, January 2005,
Pages 264–276

108. Royal Society of chemistry - Chempider. Contenido en línea:
<http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.22987.html>
109. Rubin A, Terasaki M, Sanui H. 1979. Major intracellular cations and growth control: Correspondence among magnesium content, protein synthesis, and the onset of DNA synthesis in BALB/c3T3 cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. vol. 76 no. 8 p 3917–3921.
110. Sakai H, Sakabe N, Sasaki K. 1996. Preliminary description of the crystal structure of gamma-glutamyltranspeptidase from E. coli K-12. J Biochem (Tokyo) 1996; 120: 26–8.
111. Sanchez L, Corrales L. 2005. Congelación bacteriana: Factores que intervienen en el proceso Nova - publicación científica ISSN:1794-2470 Vol.3 No. 3 enero- junio de 2005:1-120
112. Saro C, Ranilla J, Tejido M and Carro M. 2012. Influence Of Forage Type On Ruminal Microbes And Bacterial Diversity In Sheep. Animal Feed Science and Technology
113. Saro C, Ranilla M, Tejido M and Carro M. 2012b. Post-prandial changes of fiber-degrading microbes in the rumen of sheep fed diets varying in type of forage as monitored by real-time pcr and arisa. Animal Feed Science and Technology.
114. Scandolo D, Noro D, Bohmwald H, Contreras P, Wittwer. 2007. Variación diurna del pH y de las concentraciones de magnesio y potasio del fluido ruminal en vacas lecheras a pastoreo. Arch. Med. Vet. 39, N° 2, 2007
115. Schaefer D, Wheeler L, Noller C, White J, 1982. Neutralization of Acid in the Rumen by Magnesium Oxide and Magnesium Carbonate. Journal of dairy science. Volume 65, Issue 5, Pages 732-739.
116. Schonewille J. 2013. Magnesium in dairy cow nutrition: an overview. Plant and Soil July 2013, Volume 368, Issue 1-2, pp 167-178
117. Scopes R.K. 1988. Protein Purification. Springer, New York, USA.

118. Shils, M.E. 1997. Magnesium. In: O'Dell, B.L. and Sunde, R.A. (eds) Handbook of Nutritionally Essential Mineral Elements. Marcel Dekker, New York, pp. 117–152.
119. Shu Q. Liu A. 1995. Changes in Microbial Populations in the Rumen of Sheep after Overfeeding with Wheat. Recent Advances in Animal Nutrition in Australia: July 1995
120. Skoog D. West D. 2002. Introducción a la química analítica. Editorial Reverte. P. 27-29
121. Smith R. Maguire M. 1998. Microbial magnesium transport: unusual transporters searching for identity. *Molecular Microbiology* (1998) 28(2), 217–226
122. Smith, D.L., Tao, T., and Maguire, M.E. 1993. Membrane topology of a P-type ATPase: the MgtB Mg²⁺ transport protein of *Salmonella typhimurium*. *J Biol Chem* 268: 22469–22479.
123. Suga H, Cowan JA, Szostak JW. 1998. Unusual metal ion catalysis in an acyl-transferase ribozyme. *Biochemistry* 37, 10118–10125.
124. Suttle, N.F. 1987. The absorption, retention and function of minor nutrients. In: Hacker, J.B. and Ternouth, J.H. (eds) *The Nutrition of Herbivores*. Academic Press, Sydney, pp. 333–361.
125. Suzuki H. Kumagai H, Tochikura T. 1986. γ -Glutamyltranspeptidase from *Escherichia coli* K-12: Formation and Localization. *Journal Of Bacteriology*, Dec. 1986, p. 1332-1335.
126. Swain R. Nolan J. Klieve A. 1996. Natural Variability and Diurnal Fluctuations within the Bacteriophage Population of the Rumen. *Appl. Environ. Microbiol.* March 1996 vol. 62 no. 3 994-997
127. Tate SS, Meister A. 1974. Interaction of gamma-glutamyl transpeptidase with amino acids, dipeptides, and derivatives and analogs of glutathione. *J Biol Chem.* 1974; 249:7593–7602. [PubMed: 4154944]
128. Theodorou M. Williams B. Dhanoa M. McAllan A. France J. 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology*, Volume 48, Issues 3–4, August 1994, Pages 185–197

129. Theodorou, M.K., Williams, B.A., Dhanoa, M.S., McAllan, A.B., France, J. 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. 1994. *Anim. Feed Sci. Technol.* 48, 185±197.
130. Thompson GA, Meister A. 1976. Hydrolysis and transfer reactions catalyzed by gamma-glutamyl transpeptidase; evidence for separate substrate sites and for high affinity of L-cystine. *Biochem Biophys Res Commun.* 1976; 71:32–36. [PubMed: 9080]
131. Tilley J, Terry R. 1963. A two-stage technique for the in vitro digestion of forage crops. *J Br Grass Soc* 1963; 18:104-111.
132. Tohidi M, Ghasemi A, Hadaegh F, Arbabi S, Hosseini Isfahani F. 2011. Intra-erythrocyte magnesium is associated with gamma-glutamyl transferase in obese children and adolescents. *Biol Trace Elem Res.* 2011 Nov;143(2):835-43.
133. Tokoyama M. Johnson K. 1988. *Microbiología del rumen e intestino EN El rumiantes, Fisiología digestiva y Nutrición.* Church D. 1989 p137;189.
134. Tsubota H. Hoshino S. 1969. Transaminase Activity in Sheep Rumen Content. *Journal of dairy science* col. 52, no. 12.
135. Underwood, E. Suttle N. 1999. *The mineral nutrition of livestock.* CAB International ISBN 0-5199-128-9
136. Valkeners, D., A. The´wis, S. Amant, and Y. Beckers. 2006. Effect of various levels of imbalance between energy and nitrogen release in the rumen on microbial protein synthesis and nitrogen metabolism in growing double-muscled Belgian Blue bulls fed a corn silage-based diet. *J. Anim. Sci.* 84:877–885.
137. Van Lier E. Regueiro M. 2008. *Digestión en retículo – rumen.* Departamento de producción animal y de pasturas. Curso de Anatomía y Fisiología animal.
138. Van Soest P, Wine RH, Moore LA. 1966. Estimation of the true digestibility of forages by the in vitro digestion of cell walls. *Proc. 10th Int. Grasslands Congress.* Helsinki. Finnish Grassland Association. 1966; 438-441.

139. Vargas J. 1993. Efecto de tres follajes arbóreos sobre el consumo voluntario y algunos parámetros de funcionamiento ruminal en ovejas africanas. *Livestock Research for Rural Development*. Volume 5, Number 3, December 1993.
140. Vargas J. Rodríguez O. Murgueitio E y Preston T. 1992. Efecto del nivel de oferta del cogollo de caña sobre el consumo y el ecosistema ruminal en ovejas africanas. *Livestock Research for Rural Development* Volume 4, Number 1, July 1992
141. Wallace, R. J., and C. A. McPherson. 1987. Factors affecting the rate of breakdown of bacterial protein in rumen fluid. *Br. J. Nutr.* 58:313.
142. Weimer, P.J., 1996. Why don't ruminal bacteria digest cellulose faster? *J. Dairy Sci.* 79, 1496–1500
143. Whitfield J. 2001. Gamma Glutamyl Transferase. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 38(4):263–355 (2001).
144. Willey, J. D. 2004. The effect of ionic strength on the solubility of an electrolyte', *Journal of Chemical Education* 81, 1644–1646.
145. Xu K, Strauch MA.1996. Identification, sequence, and expression of the gene encoding gammaglutamyltranspeptidase in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 1996; 178: 4319–22.
146. Zeigler D. Schlegel M. Edwards M. 2003. Development Of A Rumen Fluid Preservation Technique And Application To An In Vitro Dry Matter Digestibility Assay. 2003. Nutrition Advisory Group. California State Polytechnic University Pomona

CAPITULO 4

EFFECTO DE LA INFUSIÓN INTRARUMINAL DE SALES DE Mg EN LA ACTIVIDAD *In Rumen* DE LA GGT EN GANADO LECHERO.

Wilmer A. Cuervo ^a. Héctor Jairo Correa C. ^{ab}

- a. Grupo de investigación en interacciones nutricionales, metabólicas y reproductivas ganado lechero.
- b. Departamento de producción Animal, Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín

4.1. Resumen.

iones divalentes como el Mg⁺⁺ actúan como cofactores para algunas enzimas. De estas, las aminotransferasas revisten especial importancia al transferir grupos aminos hacia cetoácidos mejorando el flujo metabólico del N. Al estar presentes en los microorganismos ruminales, el incremento en la actividad de estas enzimas posiblemente contribuya al mejoramiento en la síntesis de proteínas microbianas. Con el objetivo de complementar estudios previos acerca del efecto de la adición de sales de Mg en la actividad de la enzima gamma glutamil transferasa (GGT) se realizaron colectas por duplicado (08:00) de líquido ruminal fresco (LRF) seguidas de infusiones intraruminales con 53g de cloruro de magnesio (MgCl₂) en 3 vacas lecheras adultas canuladas al rumen (620 ± 14 Kg y 7 años). Una hora después de la infusión se colectaron muestras por duplicado de LR (LR+Mg) las cuales fueron filtradas a través de 4 capas de gasa quirúrgica y almacenadas a 39°C para su inmediato análisis. Se determinó la actividad de la GGT en las muestras de LRF y LR+Mg por medio de un kit colorimétrico. Las diferencias estadísticas entre los dos grupos (antes y después de la infusión) fueron determinadas por medio de una prueba de T. La actividad de la GGT en el LR+Mg fue superior (463,26 ± 280,9 nKtal/L) a la hallada en el LRF (124,53 ± 90,8 nKtal/L) (p<0.001) pero inferior a la de reportes previos en ovinos, indicando posibles diferencias entre especies relacionadas con la población de protozoarios o el manejo dietario, entre otras. El incremento en la actividad ruminal de la GGT que generó la infusión ruminal del MgCl₂ fue superior a la observada en experimentos in vitro previos bajo

condiciones experimentales similares. Este trabajo muestra que la GGT, más allá de ser un indicador de daño hepático, hace parte de un complejo enzimático relacionado con el balance de N en rumen. Los resultados del estudio sugieren que el Mg juega un papel importante como cofactor de esta enzima, aumentando su actividad.

Palabras Clave: *Holstein, aminotransferasas, trópico alto, kikuyo, macrominerales, Rumen*

4.2. Introducción.

La infusión de materiales compuestos o puros en órganos específicos permiten la evaluación de su solubilidad y tasa de pasaje (Kristensen et al 2010, Lemosquet et al 1997), así como su acción sobre el metabolismo tisular en rumen (Boudon et al 2007) e hígado (Waldron et al 2003). Comúnmente se han evaluado forrajes, granos y pajas (Neathery 1972, Payne et al 1972, Mehrez y Orskov 1977, Orskov y M^cDonald 1979), aceites (Krysl et al 1991) y compuestos minerales como NaHCO₃ (Hogue et al 1991) K, Ca y Mg (Tomas y Potter 1975, Wilye et al 1985). La infusión de K en rumen tiene un efecto negativo sobre la absorción ruminal y total de Mg en rumiantes (Wilye et al 1985).

Otra de las metodologías para estudiar el comportamiento de determinado material al interior del rumen es la técnica *In situ* (Goering y Van Soest 1970). Correa (2007) evaluó la liberación ruminal *in situ* de macrominerales (P, Ca, Mg y K) contenidos en forrajes. En este sentido, se ha establecido ampliamente que el Mg contenido en los pastos se libera rápidamente en el rumen (Caro y Correa 2006).

El Mg y otros iones divalentes ejercen efectos positivos (Faixová y Faix 2002) y negativos (Spears y Hatfield 1978) sobre las aminotransferasas (Faixová et al 2006). Una de estas enzimas, la Gamma glutamil transferasa (GGT), cumple en microorganismos, un papel importante en la transferencia de péptidos y aminoácidos a través de la membrana celular (Whitfield 2001).

El Mg participa activamente en procesos de transaminación como cofactor de la GGT fijando moléculas de amonio a cetoácidos receptores (como el ácido oxaloacético o α -cetoglutarato) produciendo aminoácidos como el ácido aspártico y glutámico (Conn et al 2000).

No obstante, la investigación de la liberación ruminal en fuentes inorgánicas incubadas como sales es escasa y aunque existen varias fuentes en el mercado (Óxido de Mg, Sulfato de Mg y Cloruro de Mg) no se cuenta con trabajos publicados en los que se haya medido la liberación ruminal de Mg contenido en este tipo de fuentes. Por tanto se desconoce cómo este mineral pueda afectar la actividad enzimática y con ello el uso del nitrógeno por parte de los microorganismos ruminales.

Por todo lo anterior, el principal objetivo del presente experimento fue evaluar el efecto de la infusión directa de una sal de Mg al medio ambiente ruminal sobre la actividad de la GGT en LR. Al mismo tiempo se buscó reafirmar el efecto positivo de la adición de $MgCl_2$ sobre la actividad de la GGT observado a nivel *In vitro*, así como comparar los efectos generados sobre la actividad de la GGT a nivel *In vitro* e *In rumen*.

4.3 Materiales y Métodos.

4.3.1 Localización

El trabajo de campo del experimento se llevó a cabo en el Centro de Producción Paysandú de la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín, localizado en el corregimiento de Santa Elena (Medellín, Antioquia), a 2538 msnm y que pertenece a la zona de vida de Bosque húmedo montano bajo (bH – MB; Holdridge 1996), con una temperatura promedio de 16°C. La granja experimental cuenta con praderas de kikuyo (*Cenchrus clandestinus* (Hoechst Ex Chiov) Morrone) (Chemisquy et al 2010).

El análisis de la actividad enzimática de las muestras obtenidas en campo se llevó a cabo en el laboratorio de análisis químico y bromatológico de la universidad nacional sede Medellín.

4.3.2 Animales experimentales

Se utilizaron tres vacas de la raza holstein, adultas no lactantes canuladas al rumen, con un peso y edad promedio de 620 ± 14 Kg y 7 años, respectivamente. Dichos animales fueron alimentados únicamente con pasto kikuyo a voluntad ya que el suministro de sal mineralizada fue suspendido una semana antes de la infusión, con la finalidad de eliminar el aporte de Mg proveniente de la sal. Los animales fueron trasladados del potrero hacia el corral de manejo situado al lado del ordeño a las 07:00 el día del experimento.

A pesar de que el contenido de Mg en una sal comercial es bajo (0,57%), se eliminó el aporte de este alimento para evitar confusiones a la hora de la obtención de los resultados. De igual forma el objetivo primordial del estudio era detectar el efecto del Mg adicionado en forma de sal pura y no como parte de una mezcla de alimento concentrado.

4.3.3. Procedimiento experimental.

El experimento se basó en la comparación de la actividad de la GGT en dos muestras de líquido ruminal (LR) provenientes de cada uno de los tres animales experimentales, una muestra inicial a las 07:00 y la otra una hora después de la infusión de sal de magnesio.

Las muestras de LR se extrajeron manualmente (aproximadamente 1L) y posteriormente fueron filtradas a través de cuatro capas de gasa quirúrgica de acuerdo a la metodología descrita por Goering y Van Soest (1970). El LR así obtenido fue almacenado en envases plásticos de 200 mL, fue marcado para cada animal como *liquido ruminal "Antes" (LRA)* y fue conservado en un recipiente térmico a 39°C hasta su transporte al Laboratorio. Inmediatamente después de extraer el LRA, se procedió a la infusión intra-ruminal, vía cánula, de aproximadamente 53gr de $MgCl_2$ en cada animal. Luego de una hora se

procedió a extraer 1 L de contenido ruminal por cada animal para obtener el *licor ruminal “Después”* (LRD) de cada vaca. Dichas muestras, al igual que las LRA, fueron almacenadas en envases plásticos de 200 mL, marcadas y conservadas en un termo con agua a 39°C mientras se transportaban al Laboratorio para evaluar la actividad de la GGT. En las muestras LRA y LRD, se determinó el pH mediante un potenciómetro portátil.

Posterior a la extracción del líquido se realizó un monitoreo durante dos días sobre los animales experimentales, en el que se observó el comportamiento, los desplazamientos y movimientos de las extremidades y cualquier tipo de secreción de los mismos. Todo esto debido a que se desconocen los efectos directos de la infusión ruminal de una sal pura de Mg sobre la fisiología de bovinos.

El manejo de los animales se realizó de acuerdo a las directrices del Comité de ética en Investigación de la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín, de acuerdo al proyecto radicado ante el DIME el 11 de agosto de 2010 y aprobado el 5 de octubre del mismo año (CEMED – 209) por medio del acta N° 13 del comité de ética de la Sede.

4.3.3.1 Estimación del volumen y concentración Ruminal de Mg.

Con la finalidad de estimar la concentración del Mg adicionado con la sal, se estimó que de acuerdo al peso de los animales (Jittakhot et al 2004, Schonewille et al 1999, Jhonson et al 1988), el volumen del líquido ruminal correspondía al 7,3% del peso vivo (620 ± 14 Kg), es decir, $45,1 \pm 1,022$ L. De esta forma, la concentración adicional de Mg en rumen fue $12,4 \pm 0,03 \times 10^{-3}$ mol/L.

4.3.3.2 Determinación de Actividad Enzimática GGT

Previo a la determinación de la actividad enzimática en las muestras de LR se realizó la calibración del espectrofotómetro, para lo cual se utilizó una solución blanco compuesta por 500 µL del reactivo de trabajo del kit enzimático de

Biosystems® (11520) y 500 µL de agua destilada. De igual forma se utilizó una solución patrón contenida en el kit. La determinación de la actividad de cada una de las alícuotas se alternó con la lectura del blanco con el fin de asegurar exactitud en dicha medición. Para la lectura de la actividad enzimática se utilizaron 500 µL de reactivo de trabajo, 500 µL de agua destilada y 1000 µL de la alícuota de líquido ruminal (LRA y LRB). Se realizaron seis mediciones de la actividad de la GGT en cada muestra de LRA y LRD, analizando el promedio de estas seis sub-muestras.

Se tomaron lecturas de la absorbancia a 405 nanómetros (nm) registrada cada minuto durante 3 minutos. Luego, con estos datos se estableció la diferencia entre las lecturas (Δ) y esta diferencia fue ingresada en la siguiente ecuación:

Ecuación 4.1. Determinación de la actividad enzimática

$$\Delta A / \text{min} \times \frac{V_t * 10^6}{\epsilon * I * V_s} = U / L$$

Kit No 11520 Byosistemas®

donde,

$\Delta A/\text{min}$ = Diferencia promedio entre lecturas de absorbancia

V_t = volumen total de la reacción (1,1)

ϵ = Coeficiente de absorción molar de 3-carboxy-4nitroanilina a 405nm (9900)

I = el paso de la luz (1cm)

V_s = Volumen de la muestra en mL (0,1)

La actividad enzimática fue expresada en nKtal/L de acuerdo a los procedimientos estipulados en el kit. Adicionalmente, la actividad de las muestras de LRD se expresó como porcentaje (%) de la actividad de la enzima en el LRA.

4.3.4 Análisis estadístico

La actividad de la GGT fue analizada bajo un diseño de bloques completamente al azar (BCA) en el que los bloques correspondieron a las vacas donantes de LR según el siguiente modelo:

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

donde, Y_{ijk} es la actividad de la GGT; μ es la media poblacional; T_i es el efecto del i -ésimo tratamiento experimental; B_j es el efecto del j -ésimo bloque, y e_{ijk} es el error experimental. Para ello se utilizó el PROC GLM del programa estadístico SAS 9.2. (2002).

4.4. Resultados y discusión

4.4.1. Efectos sobre el animal

No se observaron efectos adversos en el comportamiento de los animales con los niveles de Mg utilizados en la infusión (53g $MgCl_2$ /animal). Teniendo en cuenta el peso molecular del $MgCl_2$ (0,557 mol) y el volumen ruminal estimado (45,1L), mediante la infusión de 53g de $MgCl_2$ a través de la fistula, se generó una concentración adicional de $12,3 \times 10^{-2}$ mol/L a la concentración normal del rumen ($4,68 \times 10^{-3}$ mol/L). Esta concentración fue más de 3 veces superior a la adicionada en experimentos *In vitro* previos (Faixhova y Faix 2002, Faixhova et al 2006) de 5×10^{-3} mol/L y 20×10^{-3} mol/L respectivamente.

Los límites máximos de toxicidad por Mg dietario fluctúan entre $5g Mg Kg^{-1}$ de materia seca (MS) generando disminución del apetito (Gentry et al 1978) hasta $47 g Mg kg^{-1}$ de MS que pueden causar severos daños en el epitelio ruminal así como diarreas (Chester-Jones et al 1989). Sin embargo, en el presente experimento no se suplementó oralmente la dosis de Mg y la cantidad utilizada en la infusión (53g) fue equivalente a $3g Mg Kg^{-1}$ de la MS.

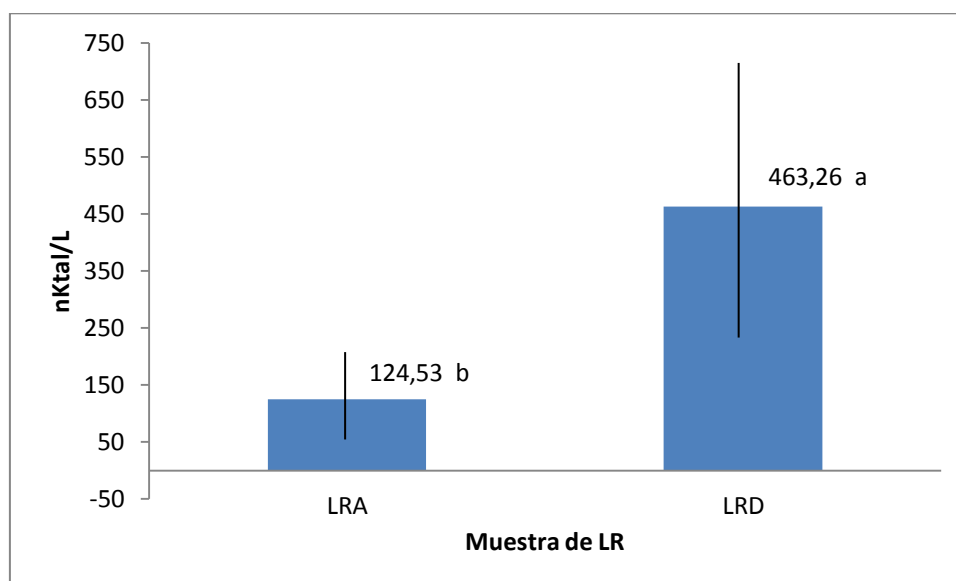
El pH promedio observado en las vacas experimentales fue de $6,65 \pm 0,4$. Este valor fue semejante al reportado previamente por varios autores que trabajaron con metodologías y animales experimentales semejantes (Schonewille et al 1999, Knowles 2012, Scandolo et al 2007, Soto et al 2005, Caro y Correa 2006, Correa et al 2008). Este pH estaría relacionado con la concentración del Mg en el LR ya que los estudios relacionados en la tabla 4.1 sugieren que a medida que el pH tiende a la alcalinidad ($>6,7$) la concentración de Mg en fluido ruminal

es mayor. Debido a que bajo estas condiciones de pH la absorción de Mg se reduce, lo mismo que la solubilidad de fuentes inorgánicas (Adedijii y Suttle 1999)

4.4.2 Actividad enzimática promedio.

El análisis estadístico mostró que ante la infusión con MgCl₂ la actividad de la GGT en el rumen se incrementa significativamente ($p < 0,004$) (ver grafica 4.1.). Estos resultados coinciden con los reportados bajo condiciones *in vitro* (capitulo 2), en el que la actividad de la GGT en el LR fresco también se incrementó ante la adición de MgCl₂ pero no con la adición de MgSO₄.

Grafica 4.1 Actividad *In rumen* de GGT en LR antes y después de la infusión de MgCl₂

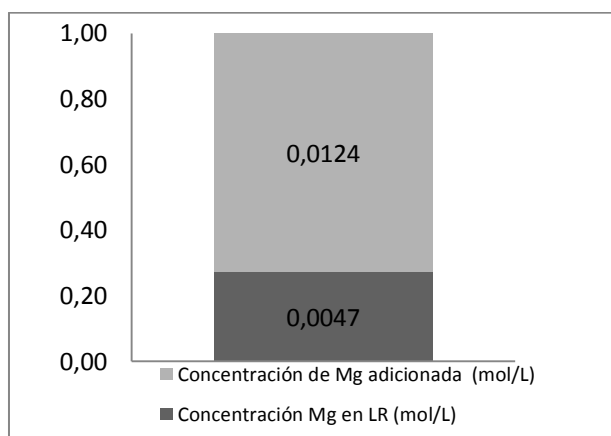


Medias con Letras iguales no presentaron diferencias significativas (T) $p < 0,001$

No existen reportes en los que se haya establecido la concentración de Mg en licor ruminal bajo condiciones similares a las realizadas en este experimento. Sin embargo, al comparar la cantidad de Mg adicionada por medio de la infusión con la concentración de Mg en LR reportada en otros trabajos

(Scandolo et al 2007, Johnson et al 1988, Schonewille et al 1999) y que osciló entre $0,5$ y $13,1 \times 10^{-3}$ mol/L (Tabla 4.1), se puede inferir que dicha adición significó un aumento de aproximadamente 260% en la concentración de este mineral en el rumen (Grafica 4.2). Este hecho puede explicar el aumento significativo en la actividad enzimática de la GGT.

Grafica 4.2 Moles de $MgCl_2$ adicionados al medio ruminal



* Asumiendo esa concentración promedio de Mg en el líquido ruminal

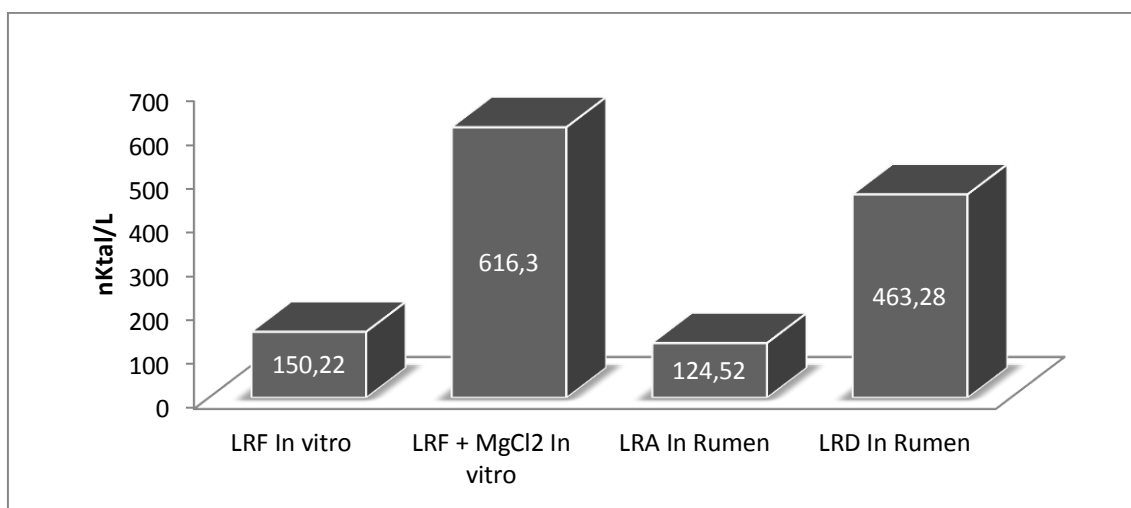
4.4.3. Infusión Mg Vs Aporte dietario y suplementario

Es pertinente considerar que el Mg dietario que alcanza el rumen no sería comparable con el Mg infundido a nivel ruminal, toda vez que es una técnica que busca estimar el comportamiento de una cantidad específica de materia prima bajo las condiciones ruminales (Pan et al 2003). La cantidad de Mg consumida por una vaca lechera está limitada principalmente por el nivel tóxico del mineral en el organismo del animal (NRC 1980). No obstante, si las condiciones de transporte activo a través de la pared ruminal es normal, el requerimiento diario de Mg para vacas lecheras adultas establecido por el NRC (2001) es de 0,2% de la materia seca. Otros autores han establecido recomendaciones que van desde 0,3% (Allsop y Rock 1972) a 0,4% de la materia seca (Okelly y Fontenont 1969), sin efectos nocivos en el consumo o aparición de diarrea ni daño de tejido ruminal.

4.4.4 Contraste de la actividad *In vitro* e *In Rumen* en Bovinos y Ovinos.

El aumento en la actividad de la GGT generado por la adición de $MgCl_2$ a nivel *In vitro* (capítulo 3) superó a la actividad de esta enzima *In rumen* después de la infusión en aproximadamente 38% (Ver grafica 4.3). Infusiones de otros minerales (K, Ca, Cl, Na) han sido previamente evaluados (Hogue et al 1990, Wylie et al 1985, Aslam et al 1991), sin embargo no se han reportado infusiones de Mg en forma de sal pura en vacas fistuladas.

Grafica 4.3 Incrementos de la actividad enzimática de GGT en LR luego de la adición de $MgCl_2$ evaluadas por técnica *In vitro* e *In rumen*



LRF = Líquido ruminal fresco

LRA= Líquido ruminal antes de la infusión ruminal de Mg

LRD = líquido ruminal después de la infusión ruminal de Mg

Como se observa en la Tabla 4.1, la actividad de la GGT en LR de ovejas reportada por Faixova y Faix 2002, faixova et al (2006), fue superior a las halladas en el experimento *in vitro* (capítulo 3) e *in rumen*, en este experimento. Estas diferencias pueden estar relacionadas con la composición de la dieta y el manejo alimenticio utilizado por estos autores (dieta con mayor contenido de ENI suplementada durante 40 días) lo que pudo cambiar las condiciones del ambiente ruminal, poblaciones microbianas y con ello la actividad enzimática.

Se han reportado cantidades superiores de bacterias y protozoos en contenido ruminal de bovinos (Kurihara et al 1968, Rosales et al 1989, Van Lier y

Regueiro 2008, Fraga et al 2012, Saro et al 2012), por lo que se pudiera sospechar, que en ovinos exista un mayor número de poblaciones bacterianas en el LR, o bien que exista una mayor concentración de protozoarios que tienen una actividad de transaminasas superior (Tsubota y Hoshino 1969). Sin embargo la determinación de la GGT (en este y otros estudios) se realizó sobre LR y no sobre el contenido, por lo que es poco probable que los cambios en la actividad de esta enzima entre estas especies se deban exclusivamente a estas diferencias.

A pesar de esto, el aumento en la actividad de la GGT causada por la adición de $MgCl_2$ observado en este estudio fue superior al reportado en Ovinos (Faixová et al 2006). Esto indica posiblemente que la inclusión directa de Mg a un medio ruminal con un plano de nutrientes inferior (proveniente de animales alimentados con dietas basadas en forrajes fibrosos, con baja energía y sin suplementación), generó una respuesta mayor en la actividad de la enzima comparado con un medio ruminal enriquecido, como lo fue el de los estudios de Faixová y Faix (2002) y de Faixová et al (2006).

Tabla 4.1 Comparación de la actividad GGT entre métodos y especies

	Faixová y Faix 2002	Faixova et al 2006	Cuervo 2011
Especie	Ovino	Ovino	Bovino
Modelo Animal	Adultos, no lactantes, 30-35 Kg PV	Adultos, no lactantes, 30-35 Kg PV	7 años, no lactantes, 620 Kg PV
Alimentación	56% heno - 44% concentrado ^a	Concentrado ^b + Premezcla min y vit	100% gramínea - Kikuyo ^c
LR extraído por muestra (mL).	200	50	100
Fuente de Mg utilizada.	$MgCl_2$	$MgCl_2$	$MgCl_2$
Concentración Mg adicionada.	5×10^{-3} - 20×10^{-3} mol/L	6×10^{-3} - 20×10^{-3} mol/L	14×10^{-3} mol/L
Método Determinación.	colorimétrico por espectrofotómetro	colorimétrico por espectrofotómetro	colorimétrico por espectrofotómetro
Unidad medición.	μ kat / L	%	nkat / L *
Kit químico utilizado.	LACHEMA lab. ®	SIGMA-aldrich ®	Biosystems ®
Act <i>in vitro</i> LR control	1,15 μ Ktal/L	100% **	0,150 μ Ktal/L
Act <i>in vitro</i> LR + $MgCl_2$	1,45 μ Ktal/L	131,60%	0,616 μ Ktal/L

<i>Act in rumen LR control</i>	<i>ND</i>	<i>ND</i>	0,124 μ Ktal/L
<i>Act in rumen + MgCl₂</i>	<i>ND</i>	<i>ND</i>	0,463 μ Ktal/L

LR: Líquido ruminal. PV: peso vivo ND: No determinado.

** 1 μ Ktal = 1000nKtal ** se tomó la actividad de GGT en LR sin adición alguna como 100%*

Concentrado ^a: melaza, avena, salvado trigo y arroz, concentrado comercial y suplemento mineral

Concentrado ^b: Alfalfa deshidratada - maíz molido (3:1). Kikuyo ^c: Pennisetum clandestinum

De igual forma, estos resultados demuestran que el suministro del Mg en forma de MgCl₂, en las cantidades trabajadas por estos autores y las de este experimento, genera una respuesta significativa y positiva sobre la actividad ruminal de la GGT.

La mayor actividad de la GGT se logra bajo específicas condiciones de laboratorio, que incluyen un pH mayor a 8 (Tate y Meister 1974, Thompson y Meister 1976) y de 29 a 30°C (Wickham et al 2011). Un ambiente ruminal normal no cumplen estos parámetros (Brod et al 1982, Weimer 1996), incluso no se reportan diferencias importantes en el pH (Scandolo et al 2007, Mojica et al 2009, Mouriño et al 2001) o en la temperatura ruminal (Brod et al 1982, Beatty et al 2008) entre las dos especies, por lo que las diferencias observadas entre la actividad de la GGT entre estas dos especies no estarían relacionadas con este parámetro.

4.4.4.1. Efecto de la Dieta.

La actividad enzimática en rumen depende de diversos factores, entre los que se citan el pH (Tate y Meister 1974) la temperatura (Wickham et al 2011), la disponibilidad de sustratos (Pabon 2004) y el tipo de poblaciones microbianas presentes en el medio (Tsubota y Hoshino 1969). Es importante señalar que, la mayor actividad ruminal de aminotransferasas (en ovejas) se presenta en un pH entre 5 y 6, y que dentro de los microorganismos ruminales, son los protozoarios los que presentan mayor actividad de este tipo de enzimas (Tsubota y Hoshino 1969, Bhatia et al 1979).

El número y tipo de población de microbios en rumen, son afectados al mismo tiempo por el pH ruminal (Hobson and Stewart 1997) pero principalmente por el tipo y composición de la dieta (Dehority y Orpin 1997). En este sentido, se ha demostrado que la suplementación de carbohidratos no estructurales (CNE) (Carruthers y Neil 1997), de almidones (Stewart 1977) y de alimentos concentrados con carbohidratos rápidamente fermentables (Terry et al 1969) disminuye el pH ruminal en bovinos, así como la digestión de la fibra (Burroughs et al 1949, El-Shazly et al 1969, Mertens y Loften 1980, Mould y Ørskov, 1984).

Igualmente, el nivel de fibra en la dieta afecta el pH tanto en bovinos como en ovinos. Weimer et al (1999) observaron un menor pH ruminal en vacas lecheras alimentadas con altas inclusiones dietarias de grano de maíz (31% Vs 2%), mientras que Giri et al (2005) reportan una caída abrupta del pH a las 4 horas luego de suministrar dietas con altos niveles de concentrado y bajos de fibra cruda.

Con relación al balance de poblaciones ruminales, niveles crecientes de salvado de trigo (38,5% FDN), están relacionados con un aumento general de la actividad enzimática de organismos proteolíticos y una disminución significativa en las poblaciones de protozoarios ciliados (Giri et al 2005). Así mismo, aumentos en la inclusión de ensilajes fibrosos (Maíz y Alfalfa) se han relacionados con un mayor número de poblaciones fibrolíticas (Weimer et al 1999).

Por otro lado, leguminosas arbóreas (*Enterolobium cyclocarpum*) suplementadas en Bovinos, pueden aumentar ligeramente la población de microorganismos celulolíticos sin afectar la población de protozoarios (Galindo et al 2001). Otros aditivos como la urea, han generado un ligero aumento en el número de *Fibrobacter succinogenes* y en la actividad enzimática de endoglucanasas y xilanasas, sin llegar a ser estadísticamente significativo (Pan et al 2003).

De tal manera que los efectos de la dieta sobre la actividad enzimática se evidencian en condiciones experimentales, donde con un alto aporte de CNE en la dieta (especialmente almidón proveniente de cereales), un bajo pH (hasta

5,5) se observan cambios en las poblaciones ruminales, especialmente de protozoarios (Wattiaux y Armentano, Oetzel 2003, Campos 2008), lo cual puede explicar, al menos en ovejas (Tsubota y Hposhino 1969), la mayor actividad enzimática de aminotransferasas reportada en experimentos previos (Faixová y Faix 2002, faixová et al 2006). Al contrario, en el presente estudio los animales fueron alimentados con forraje kikuyo (*Cenchrus clandestinum*), un alimento con bajo aporte de CNE (Correa et al 2008) el cual en condiciones de manejo similares a las utilizadas en el experimento, puede generar un pH ruminal entre 6,7 y 6,8 (Correa et al 2012), lo cual puede estar relacionado con cambios en poblaciones ruminales, afectando de paso la actividad enzimática de las mismas.

4.5. Conclusiones.

La infusión directa en el rumen de sales de Mg en las dosis utilizadas, no generó efectos adversos sobre la salud o el comportamiento normal de los animales experimentales.

Bajo las condiciones experimentales en las que se desarrolló este trabajo, se puede concluir que la infusión de $MgCl_2$ al rumen aumenta significativamente la actividad de la GGT ($p < 0,01$).

El aumento en la actividad ruminal de GGT luego de la adición de Mg que se observó a nivel *In rumen* fue inferior al reportado en las pruebas *In vitro* lo que podría estar relacionado con la concentración de Mg infundida con respecto al volumen del líquido contenido en rumen comparado con el volumen experimental utilizado en la técnica *in vitro*.

Es posible que la diferencia en la actividad enzimática observada entre el presente estudio (bovinos) y reportes previos (ovinos) esté relacionada con el contenido de microorganismos (protozoarios) en el medio líquido y por el régimen dietario que recibieron los animales experimentales del presente estudio.

Estos resultados demuestran que el suministro del Mg en forma de $MgCl_2$, en las cantidades utilizadas en este experimento y en reportes previos, genera una respuesta significativa y positiva sobre la actividad ruminal de la GGT.

Basado en el supuesto de que el régimen dietario afecta la actividad de la GGT, se podría esperar que en animales alimentados con dietas fibrosas, pobres en energía y sin suplementación de CNE, la respuesta a la adición de $MgCl_2$ sobre la actividad de esta enzima en rumen pueda ser mayor que en animales con regímenes alimenticios adecuados.

4.6 Recomendaciones

Es recomendable realizar un estudio similar a este, determinando la actividad de otras enzimas tipo aminotransferasas, relacionadas con la fijación de NNP y de síntesis de proteína microbiana.

Para realizar comparaciones más exactas entre la actividad enzimática ruminal de ovinos y Bovinos, se recomienda incluir en la metodología, la suplementación de granos y/o alimentos concentrados (mayor aporte de CNE) que permitan obtener condiciones ruminales similares de reportes previos.

Si bien se observó el aumento en la actividad de una enzima que mejora la utilización de nitrógeno no proteico (NNP), es necesario evaluar el efecto que éste tenga sobre el uso del N en el animal hospedero. Bajo el supuesto de que un incremento en la actividad de la GGT mejora la incorporación de NNP en compuestos orgánicos, podría esperarse, no solo un incremento en la población bacteriana sino además, mejoras en la eficiencia del uso de nitrógeno por parte del animal hospedero.

Se recomienda realizar un estudio en el que posterior a la infusión ruminal de Mg como sal pura, sea determinada de manera periódica (cada hora) la

actividad de la enzima GGT, lo cual ampliaría el panorama de la información obtenida y facilitaría la explicación de los resultados obtenidos.

Agradecimientos

El autor agradece profundamente la ayuda en el trabajo de campo que recibió de Cesar David Orrego Wilcheth, compañero de la maestría, al Doctor Hector Jairo Correa Cardona quien en todo momento acompañó la realización del experimento y asesoró los análisis de laboratorio y al Doctor Guillermo Correa por la constante asesoría en cuanto al establecimiento del modelo estadístico a utilizar.

Abstract

Divalent ions such as Mg⁺⁺ act as cofactors for some enzymes. Of these the aminotransferases are a very important group for transferring amino groups to keto acids, improving the N metabolic flux. By being present in the rumen microorganisms, increasing the activity of these enzymes may contribute to improved microbial protein synthesis. With the objective of complement previous reports of the magnesium salts effect on the gamma glutamyl transeferase activity (GGT), it was collected ruminal liquor samples (LRF) in duplicate from 3 adult, non-lactating, canulated cows (620Kg) at 08:00, followed of intra-ruminal infusion with 53g of magnesium chloride (MgCl₂) at 09:00, in this time was collected a second LR sample (LR+Mg) wich were filtered through four layers of surgical gauze and stored at 39 ° C for immediate analysis in the laboratory of the National University of Colombia. Was determinate the GGT activity on the LRF and LR+Mg samples by using a colorimetric kit of Biosystems. The statistical differences between the two groups (after and before of the infusion) were determined through a t-test using the MEANS command of the statistical software SAS 9.0 (2002). Intake and behavior negative effects were not observed, however it was observed a high individual enzyme activity variation among experimental animals. This analysis reveals that LR+Mg samples showed statistically higher activity enzyme of GGT. Mean

test showed that LR+Mg samples showed an average activity of 463.26 nKtal / L statistically superior ($p < 0.001$) in contrast to 124.53 nKtal / L of the LRF samples. However the observed GGT activity was inferior to previous experiments in Sheep, but was greater than that shown in previously in vitro experiments with cattle under similar conditions. These results may indicate possible differences between species, such as protozoa populations or diet regimen. The present study shows that GGT besides to be a hepatic disorder indicator, is part of an enzymatic complex related with the N balance in rumen. Additionally the registered data suggest that the Mg plays an important role as cofactor of this enzyme, increasing his activity.

Keywords: *Holstein, aminotransferases, High Trópico, Cenchrus clandestinum, macrominerals, Rumen*

Bibliografía Citada

- 1. Adediji, O. and Suttle, N.F. 1999** Influence of diet type, potassium and animal species on the absorption of magnesium by ruminants. Proceedings of the Nutrition Society 58, 31A.
- 2. Allen, V. G. and J. P. Fontenot. 1984.** Influence of aluminum as sulfate, chloride and citrate (m magnesium and calcium metabolism in shccp. J, Anita. Sci. 59:798.
- 3. Alvarado S. Arreaza L. Torrezoza L. 2000.** Estrategias de alimentación en confinamiento para novillas de levante doble propósito f2 durante la época seca utilizando ensilaje de maíz más suplemento. MVZ - CÓRDOBA 2000; 5:(2), 36.
- 4. Arias L. Chamorro D. 2009.** Evaluación de la producción de biomasa y la calidad nutricional de dos arreglos silvopastoriles multiestrato, Parte II. Rev Colomb Cienc Pecu 2009; 22:3
- 5. Beatty D. Barnes A. Taylor E. Maloney S. 2008.** Do changes in feed intake or ambient temperature cause changes in cattle rumen temperature relative to core temperature?. Journal of Thermal Biology,

6. Bender D, Mayes P. 2003 Vitamins & Minerals. In Harper's Illustrated Biochemistry. Cap 45 p489
7. **Betancur J F y Trujillo L G 2004** Balance de nitrógeno en vacas lecheras de alta producción alimentadas con pasto kikuyo (*Pennisetum clandestinum*) y dos niveles de suplementación de proteína no degradable en el rumen. Trabajo de grado de Zootecnia, Departamento de Producción Animal, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia, Medellín. 30p.
8. **Bhatia S. Pradhan K. Singh R. 1979.** Microbial Transaminase Activities and Their Relationship with Bovine Rumen Metabolites. *J Dairy Sci* 62:441-446.
9. **Boling, J.A., Okolo, T.O., Gay, N. and Bradley, N.W. 1979.** Effect of magnesium and energy supplementation on blood constituents of fall-calving beef cows. *Journal of Animal Science* 48, 1209–1215.
10. **Boudon A. Faverdin R. Delagarde P. Lambertton J. Peyraud L. 2006.** Effects of Rumen or Duodenal Glucose Infusions on Intake in Dairy Cows Fed Fresh Perennial Ryegrass Indoors. *JDS*.2006-632
11. **Brod D. kolsen K. Brent B. 1982.** Effect of Water Temperature in Rumen Temperature, Digestion and Rumen Fermentation in Sheep. *J ANIM SCI* 1982, 54:179-182.
12. **Brooks S. Lampi B. 1995.** The effect of changing dietary fat and carbohydrate on the enzymes of amino acid metabolism. *Jornal of nutritional biochemistry* Vol 6(8) p414-421.
13. **Burroughs, W., W. P. Gerlaugh, B. H. Edgingron, and R. M. Bethke. 1949.** The influence of corn starch upon roughage digestion in cattle. *J. Anita. Sci.* 8:271
14. **Campos R. Cubillos C. Rodas A. 2007.** Indicadores metabólicos en razas lecheras especializadas en condiciones tropicales en Colombia. *Acta Agron (Colombia)* Vol 56(2) 2007. P 85-92.
15. **Canchila E. Posada R. Barbosa H. 2009.** Evaluación de la degradabilidad in situ de la materia seca del fruto de palma de aceite y la pollinaza en animales bovinos. *Rev Colomb Cienc Pecu* 2009; 22:3

- 16. Cárdenas P. Machado J. 2012.** Evaluación del consumo de sal de los bovinos de la finca rivera CORHUILA. Revista Conocimiento. Volumen V Número I Diciembre de 2012.
- 17. Caro y Correa 2006.** Digestibilidad posruminal aparente de la materia seca, la proteína cruda y cuatro macrominerales en el pasto kikuyo (*pennisetum clandestinum*) cosechado a dos edades de rebrote. *Livestock research for rural development* 18 (10)
- 18. Carruthers, V.R. & Neil, P.G., 1997.** Milk production and ruminal metabolites from cows offered two pasture diets supplemented with non-structural carbohydrate. *N. Z. J. Agric. Res.* 40, 513-521.
- 19. Carulla J E, Cárdenas E, Sánchez N y Riveros C 2004 .** Valor nutricional de los forrajes más usados en los sistemas de producción lechera especializada de la zona andina colombiana; En: *Eventos y Asesorías Agropecuarias EU* (ed.), Seminario Nacional de Lechería Especializada: “Bases Nutricionales y su Impacto en la Productividad”. Medellín, septiembre 1 y 2: 21 – 38.
- 20. Ceballos A. Villa N. Betancourth Tania. Roncancio D. 2004.** Determinación de la concentración de calcio, fósforo y magnesio en el periparto de vacas lecheras en Manizales, Colombia. *Rev Col Cienc Pec* Vol. 17:2, 2004
- 21. Chemisquy A. Giussani L. Scataglini M. Kellog E. Morrone O. 2010.** Phylogenetic studies favour the unification of *Pennisetum*, *Cenchrus* and *Odontelytrum* (Poaceae): a combined nuclear, plastid and morphological analysis, and nomenclatural combinations in *Cenchrus*. *Annals of botany.* 2010 Vol 106 Issue 1, Pages 107-130.
- 22. Chester-Jones, H., Fontenot, J.P., Veit, H.P. and Webb, K.E. 1989** Physiological effects of feeding high levels of magnesium to sheep. *Journal of Animal Science* 67, 1070–1081.
- 23. Conn E. Stumpf P. Bruening G. Doi R. 2000.** *Bioquímica Fundamental.* 5ta edición. ISBN 968-18-5231-1.
- 24. Consejo Regional de la Cadena Láctea de Antioquia 2001.** Acuerdo de competitividad de la cadena láctea de Antioquia; Medellín. 75 p www.agrocadenas.gov.co/documentos/documentos_iica/No%2020.pdf

- 25. Correa C, M L Pabón R* y J E Carulla F. 2008.** Valor nutricional del pasto kikuyo (*Pennisetum clandestinum* Hoechst Ex Chiov.) para la producción de leche en Colombia (Una revisión): I - Composición química y digestibilidad ruminal y posruminal. *Livestock Research for Rural Development* 20 (4) 2008
- 26. Correa H. 2001.** Caracterización del periodo de transición. curso de educación continuada: Nutrición y alimentación de la vaca en transición. Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín. Contenido en línea. <http://www.agro.unalmed.edu.co/v2/departamentos/panimal/docs/caracterizatransi.pdf>
- 27. Correa H. 2009.** Producción de leche con base en pasturas: el caso de los hatos especializados en Colombia. *Revista Facultad Nacional de Agronomía. Medellín, Vol 62 (Supl. 1): 1-5. ISSN: 0304-2847*
- 28. Correa H. Rodriguez Y. Pabon M. Carulla J. 2012.** Efecto de la oferta de pasto kikuyo (*Pennisetum clandestinum*) sobre la producción, la calidad de la leche y el balance de nitrógeno en vacas Holstein. *Livestock Research for Rural Development* 24 (11) 2012.
- 29. Correa H. Rojas H. Ceron J. Pabon M. Carulla J. 2011.** MUN: herramienta para mejorar el contenido de proteína en la leche. VII seminario Competitividad en carne y leche, Cooperativa Colanta.
- 30. Correa H.J. 2007.** Cinética de la liberación ruminal de macrominerales en pasto kikuyo (*pennisetum clandestinum*) cosechado a dos edades de rebrote. *Livestock Research for Rural Development* 18 (2) 2006. <http://www.lrrd.org/lrrd18/2/corr18031.htm>.
- 31. Cuervo W. Orrego C. Correa H. 2011.** Efecto de la adición de sales de magnesio sobre la actividad ruminal in vitro de γ glutamil transferasa. *Rev Colomb Cienc Pecu* 2011; 24:3.
- 32. Cuervo W. Orrego C. Correa H. 2011b.** Determinación de la actividad in situ de gama glutamil transferasa (GGT) bajo el efecto de infusión ruminal de magnesio. *Rev Colomb Cienc Pecu* 2011; 24:3.
- 33. Daryl K, Granner M. 2003** *The Diversity of the Endocrine System.* In *Harper's Illustrated Biochemistry.* Cap 42 p441

- 34. Dalley, D. E., P. Isherwood, A. R. Sykes, and A. B. Robson. 1997.** Effect of intraruminal infusion of potassium on the site of magnesium absorption within the digestive tract in sheep. *J. Agric. Sci.* 129:99–105
- 35. Dehority B. Orpin C. 1997.** Development of and natural fluctuations in, rumen microbial populations. *The Rumen Microbial Ecosystem.* 1997, pp 196-245
- 36. Ding Y. Zhang G. Wu H. Hai B. Wang L. Qian Y. 2001.** Nanoscale Magnesium Hydroxide and Magnesium Oxide Powders: Control over Size, Shape, and Structure via Hydrothermal Synthesis. January 12, 2001 Copyright © 2001 American Chemical Society
- 37. Douglas G, Overton T, Bateman H, Dan H, Drackley J. 2006.** Prepartal Plane of Nutrition, Regardless of Dietary Energy Source, Affects Periparturient Metabolism and Dry Matter Intake in Holstein Cows. *J. Dairy Sci.* 89:2141–2157
- 38. El-Shazly, K., B. A. Dehority, and R. R. Johnson. 1961.** Effect of starch on the digestion of cellulose in vitro and in vivo by rumen microorganisms. *J. Anita. Sci.* 20:268.
- 39. Faixová Z, Faix F. 2002.** Influence of metal ions on ruminal enzyme activities *Acta vet. Brno* 2002, 71: 451–455
- 40. Faixová zita, faix, maková, váczzi, prosbová. 2006.** Effect of divalent ions on ruminal enzyme activities in sheep. *Acta veterinaria (beograd)*, V56(1), 17-23,
- 41. Faverdin, P., B. Richou, and J.-L. Peyraud. 1992.** Effects of digestive infusions of volatile fatty acids or glucose on food intake in lactating or dry cows. *Ann. Zootech. (Paris)* 41:93.
- 42. Findeisen, R. 1972.** Untersuchungen fiber Aktivitiit der ~,-Glutamyl-transpeptidase im Serum gesunder und kranker Rinder. Inaug. Diss. Med. Vet. Hanhover.
- 43. Fiems, L. O., B. G. Cottyn, Ch. V. Boucque´, J. M. Vanacker, and S. De Campeneere. 1999a.** Effect of different degraded protein balances (OEB) on the performance of beef bulls and on digestibility and rumen fermentation in sheep. *Neth. J. Agric. Sci.* 47:17–28.
- 44. Fraga M, Perelmuter K, Valencia M J, Cajarville C, Zunino P. 2012.** Caracterización de la microbiota bacteriana ruminal de un bovino a

- pastoreo mediante técnicas clásicas e independientes del cultivo. VETERINARIA (Montevideo) - Vol. 49 - # 189 - Año 2013 - P. 40 a 55
- 45. Galindo J. Gonzalez N. Aldama A. Marrero Y. 2001.** Efecto de *Enterolobium cyclocarpum* en la población microbiana ruminal y su actividad en condiciones in vitro. Revista Cubana de Ciencia Agrícola, Tomo 35, No. 3, 2001. 241.
- 46. GANASAL Colombia ®.** Producto comercial: Sal mineralizada para ganado lechero colombiano. contenido en línea: <http://www.ganasal.com/productos/ganasal-leche/>.
- 47. Garcia A. 2009.** Alimentación preventiva de la vaca en transición. Extension Extra. South Dakota University. Contenido en línea: <http://agbiopubs.sdstate.edu/articles/ExEx4041S.pdf>.
- 48. Garcia-Gomez, F. Williams P. Aumaitre A. Lee, Bd, Ha, Jk 2000.** Magnesium metabolism in ruminant animals and its relationship to other inorganic elements. Proceedings of the 2000 International Symposium: Recent Advances in Animal Nutrition, Seoul, Korea, 20-22 April 2000. Asian-Austr J Anim Sci 13: 158-170
- 49. García-sanmartín J. García-perez A. Barandika J. Adúriz G. Ziluaga I. Juste R. Berriatua, E. 2001.** Actividad sérica de gamma-glutamyltransferasa (GGT) y aspartato aminotransferasa (AST-GOT) en ovejas del país vasco. Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario (NEIKER), 48160 - Derio. Bizkaia.
- 50. Gentry, R.P., Miller, W.J. and Pugh, D.G. 1978.** Effects of feeding high magnesium to young dairy calves. Journal of Dairy Science 61, 1750.
- 51. Giduck S. Fontenot J and Rahnema S. 1988.** Effect of Ruminant Infusion of Glucose, Volatile Fatty Acids and Hydrochloric Acid on Mineral Metabolism in Sheep. J Anim Sci 1988. 66:532-542
- 52. Giri S. Jaggi S. Pathak N. 2005.** Feeding of grainless diets containing different nitrogen sources to crossbred growing bulls: effects on rumen fermentation pattern, microbial enzyme activity and ciliate protozoa population. Animal Feed Science and Technology. 118 (2005) 187–200
- 53. Goering, H. K. and P.J. Van Soest. 1970.** Forage Fiber Analysis (apparatus, reagents, procedures and some applications). USDA Agricultural Handbook No. 379.

- 54.** Gojon H, Siqueiros D, Contreras H. 1998. Digestibilidad ruminal y degradabilidad in situ de *macrocystis pyrifera* y *sargassum* spp. en ganado bovino. *Ciencias Marinas*, vol. 24, núm. 4, diciembre, 1998, pp. 463-481, Universidad Autónoma de Baja California México
- 55.** **Greene, L. W., Fontenot, J.P. and Webb Jr., K.E. 1983.** Site of magnesium and other macromineral absorption in steers fed high levels of potassium. *J. Anim. Sci.* 57:503
- 56.** Harris, B., Jr., H. H. Van Horn, K. E. Manookian, S. P. Marshall, M. J. Taylor, and C. J. Wilcox. 1983. Sugar-cane silage, sodium hydroxide and steam pressure-treated sugarcane bagasse, corn silage, cotton seed hulls, sodium bicarbonate and aspergillus oryzae product in complete rations for lactating cows. *J. Dairy Sci.* 66:1474.
- 57.** **Hashimoto W, Suzuki H, Yamamoto K, Kumagai H. 1997.** Analysis of low temperature inducible mechanism of gamma-glutamyltranspeptidase of *Escherichia coli* K-12. *Biosci Biotechnol Biochem.* 1997 Jan;61(1):34-9.
- 58.** **Henry, P.R. and Benz, S.A. 1995.** Magnesium bioavailability. In: Ammerman, C.B., Baker, D.H. and Lewis, A.J. (eds) *Bioavailability of Nutrients for Animals*. Academic Press, New York, pp. 239–256.
- 59.** **Hobson PN and Stewart C S. 1997.** *The Rumen Microbial Ecosystem*, Blackie Academic & Professional, London.
- 60.** **Hogue J. Tucker W. Van koevering T. Vernon K and Adams G. 1991.** Controlled Ruminal Infusion of Sodium Bicarbonate. 1. Influence of Postfeeding Infusion Interval on Ruminal Milieu. <http://www.exopol.com/seoc/docs/0g1m78f4.pdf>
- 61.** **Hurley W 2006.** Lactation biology Website. Department of Animal Sciences University of Illinois, Urbana, IL
- 62.** Hutjens M. 1991. *Feed Additives: Which, When, and Why*. livestocktrail.illinois.edu
- 63.** **Jittakhot S. Schonewille J. Wouterse H. Yuangklang C, and Beynen C. 2004.** Apparent Magnesium Absorption in Dry Cows Fed at 3 Levels of Potassium and 2BY. *J. Nutr.* (1967), 21, 819 819

- 64. Johnson, C.L., Helliwells, S.H. and Aubrey Jones, D.A. 1988.** Magnesium metabolism in the rumens of lactating dairy cows fed on spring grass. *Quarterly Journal of Experimental Physiology* 73, 23–31.
- 65. Knowless M. 2012.** Efecto de la fuente y el nivel de almidón en la dieta de vacas holstein lactantes sobre la producción y el contenido de proteína en la leche. Tesis de Maestría. Biblioteca digital Universidad nacional de Colombia. Contenido en línea <http://www.bdigital.unal.edu.co/8708/1/780206.2012.pdf>.
- 66. Kohn R. A., Dinneen M. M. and Russek-Cohen E. 2005.** Using blood urea nitrogen to predict nitrogen excretion and efficiency of nitrogen utilization in cattle, sheep, goats, horses, pigs, and rats. *J. Anim. Sci.* 83:879–889
- 67. Kristensen N. Storm A and Larsen M. 2010.** Effect of dietary nitrogen content and intravenous urea infusion on ruminal and portal-drained visceral extraction of arterial urea in lactating Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 93 :2670–2683
- 68. Krysl LJ, Judkins MB, Bohman VR. 1991.** Influence of ruminal or duodenal soybean oil infusion on intake, ruminal fermentation, site and extent of digestion, and microbial protein synthesis in beef heifers consuming grass hay. *J Anim Sci.* 1991 Jun;69(6):2585-90.
- 69. Kurihara Y. Eadie J. Hobson P. Mann S. 1968.** Relationship between bacteria and ciliate protozoa in the rumen sheep. *J. Gen. Microbiol.* (1968) 51, 267 – 288.
- 70. Lee, S.R. and Britton, W.M. (1987)** Magnesium-induced catharsis in chicks. *Journal of Nutrition* 117, 1907–1912.
- 71. Lemosquet. S., N. Rideau, H. Rulquin, P. Faverdin, and J. Simon. 1997.** Effect of a duodenal glucose infusion on the relationship between plasma concentrations of glucose and insulin in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 80:2854–2865.
- 72. Mader, T.L., Teeter, R.G. and Horn, G.W. 1984.** Comparison of forage labeling techniques for conducting passage rate studies. *Journal of Animal Science* 58, 208–212.
- 73. Martens, H. and Blume, I. 1986.** Effect of intraruminal sodium and potassium concentrations and of the transmural potential difference on

- magnesium absorption from the temporarily isolated rumen of sheep. Quarterly Journal of Experimental Physiology 71, 409–415
- 74. Mehrez A Z & Ørskov E R 1977.** A study of the artificial fibre bag technique for determining the digestibility of feeds in the rumen Journal of Agricultural Science Cambridge 88:645-650
- 75. Meissonnier, E., and P. Rousseau, 1976.** Les tests enzymatiques dans l'exploration fonctionnelle du foie chez les bovins. Page 633 in Reports and abstracts of the 9th international congress on diseases of cattle. Meissonnier, E., ed. ITCF, 91720, Maisse, France
- 76. Mertens, D. R., and J. R. Loften. 1980.** The effects of starch on forage fiber digestion kinetics in vitro. J. Dairy Sci. 63:1437
- 77. Minson, D.J. 1990.** Forage in ruminant nutrition. Academic Press, San Diego. CA.
- 78. Miyazaki, S. 1991.** Effect of chemicals on glutathione peroxidase of chick liver. Research in Veterinary Sc. 51: 120-122
- 79. Monsalve F. 2004.** Comparación de dos métodos para estimar la digestibilidad posruminal de la proteína cruda del pasto kikuyo (*Pennisetum clandestinum*). Trabajo de grado de Zootecnia, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia, Medellín. 18 p.
- 80. Mould, F.L. & Ørskov, E.R., 1984.** Manipulation of rumen fluid pH and its influence on cellulolysis in sacco, dry matter degradation and the rumen micro flora of sheep offered either hay or concentrate. Anim. Feed Sci. Technol. 10, 1-14
- 81. Neathery M W 1972.** Conventional digestion trials vs nylon bag technique for determining seasonal difference in quality of midland Bermuda grass Journal of Animal Science 34: 1075-1084.
- 82. Noda, C., Nakamura, T., and Ichihara, A. 1983.** Cr-adrenergic regulation of enzymes of amino acid metabolism in primary cultures of adult rat hepatocytes. J. Biol. Chem. 258, 1520-1525
- 83. Nutrient Requirements of Dairy Cattle 2001.** Seventh Revised Edition.
- 84. Ogawa, H., Fujioka, M., Su, Y., Kanamoto, R., and Pitot. H.C. 1991.** Nutritional regulation and tissue-specific expression of the serine dehydratase gene in rat. J. Biol. Chem. 266, 20412-20417

- 85. Ørskov F and McDonald 1979.** The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. *Journal of Agricultural Science, Cambridge* 92: 499-503
- 86. Ortega M. Carranco M. 1993.** Factores que afectan la digestibilidad in situ de 10s alimentos en el rumen. *Vet Mex.* 24 (1) 1993.
- 87. Pabon M 2004.** Notas de clase bioquímica ruminal. Facultad de ciencias Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá
- 88. Pan J. Suzuki T. Koike S. Ueda K. Kobayashi Y. 2003.** Effects of urea infused into the rumen on liquid- and particle-associated fibrolytic enzyme activities in steers fed low quality grass hay. *Animal Feed Science and Technology.* 104 (2003) 13–27
- 89. Paladines O. Leal J. 1979.** Manejo y productividad de las praderas en los llanos orientales de Colombia. En producción de pastos en suelos ácidos de los trópicos. P 330 – 355.
- 90. Pardo O. Carulla J. Hess H. 2008.** Efecto de la relación proteína y energía sobre los niveles de amonio ruminal y nitrógeno ureico en sangre y leche, de vacas doble propósito del piedemonte llanero, Colombia. *Rev Colomb Cienc Pecu.* 2008; 21:387-397.
- 91. Patterson J and Hespell R. 1985** Glutamine synthetase activity in the ruminal bacterium *Succinivibrio dextrinosolvens*. *Journal of Applied and Environmental Microbiology.* 50(4): 1014-1020
- 92. Payne M J, MacLeod M N & Dekker R F M. 1972.** Digestion of the dry matter, nitrogen, phosphorus, sulphur, calcium and detergent fibre fractions of the seed and pods of *Stylosanthes humilis* contained in terylene bags in the bovine rumen *Journal of Science of Food and Agriculture* 23: (8) 925-932
- 93. Petersen G, Pedersen C, Lindemann M, Stein H. 2011.** Relative bioavailability of phosphorus in inorganic phosphorus sources fed to growing pigs. doi: 10.2527/jas.2009-2161J ANIM SCI vol. 89 no. 2 460-466
- 94. Posada S. Rosero R. Rodriguez N. Costa Cruz A. Gazzinelli Neves M. De Melo A. Valadares R. Fenati L. Cruz R. 2009.** Determinación de requerimientos y eficiencia energética en ganado cebú. *Rev Colomb Cienc Pecu* 2009; 22:3

95. Quin, J.I., Watli van cler, J.G. and Mybiirgli, S. 1938. Stiidies on the alimentary tract of Merino sheep in South Africa. 4. Description of experimental tecniqrie. Onderstepoort J. vet. Sn. Anim. Znd., 11: 341-360
96. **Rico A.G. Braun J.P. Benard P. 1977.** Blood and Tissue Distribution of Gamma Glutamyl Transferase in the Cow . J Dairy Sci 60:1283-1287
97. **Rios J. 1974.** Una nota sobre el consumo de sales minerales en bovinos de carne a pastoreo. Agronomía Tropical 24(3): 227-234. 1974.
98. Roche J, Petch S, Kay J. 2005. Manipulating the Dietary Cation-Anion Difference via Drenching to Early-Lactation Dairy Cows Grazing Pasture Journal of Dairy Science Volume 88, Issue 1, January 2005, Pages 264–276
99. **Rodwell V 2003.** Biosynthesis of the Nutritionally Nonessential Amino Acids In Harper´s Biochemistry 26th Edition. Cap 28.
100. **Rogers, J. A., and C. L. Davis. 1982.** Effects of inttanuninal infusions of mineral salts on volatile fatty acid prodnction in steers fed high-grain and highroughage diets. J. Dairy Sci. 65:953.
101. **Roldan A. Perdomo P. Sánchez H. Ramirez M. 2000.** Tecnificación del sistema de producción ganadera de doble propósito en el trópico alto andino Colombiano: amamantamiento restringido. Livestock Research for Rural Development 12 (2) 2000
102. **Rosales M. Laredo M. Cuesta A. Anzola H. Hernández L. 1989.** Uso de árboles forrajeros para el control de protozoarios ruminales. Livestock Research for Rural Development Volume 1, Number 1, November 1989.
103. Rubin A, Terasaki M, Sanui H. 1979. Major intracellular cations and growth control: Correspondence among magnesium content, protein synthesis, and the onset of DNA synthesis in BALB/c3T3 cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. vol. 76 no. 8 p 3917–3921.
104. **Saro C. Ranilla J. Tejido M and Carro M. 2012.** Influence Of Forage Type On Ruminal Microbes And Bacterial Diversity In Sheep. Animal Feed Science and Technology
105. **Saro C. Ranilla M. Tejido M and Carro M. 2012b.** Post-prandial changes of fiber-degrading microbes in the rumen of sheep fed diets

varying in type of forage as monitored by real-time pcr and arisa. *Animal Feed Science and Technology*

106. **Scandolo D. Noro M. Böhmwald H, Contreras P, Wittwer F. 2007.** Variación diurna del pH y de las concentraciones de magnesio y potasio del fluido ruminal en vacas lecheras a pastoreo. *Arch. Med. Vet.* 39, N° 2, 2007.
107. **Schonewille J, H. Everts, Jittakhot S, y Beynen A 2007.** Quantitative Prediction of Magnesium Absorption in Dairy Cows. *J. Dairy Sci.* 91:271–278.
108. **Schonewille, J. T. 1999.** Magnesium absorption in ruminants. Ph.D. Thesis, Utrecht University, Utrecht, The Netherlands.
109. Schonewille J. 2013. Magnesium in dairy cow nutrition: an overview. *Plant and Soil* July 2013, Volume 368, Issue 1-2, pp 167-178
110. **Scott, D. 1966.** The effects of sodium depletion and potassium supplementation upon electrical potentials in the rumen of the sheep. *Quarterly Journal of Experimental Physiology* 51, 60–69.
111. **SOMEX Colombia ®.** Producto comercial: Calcileche 12%. Contenido en línea: http://www.somex.com.co/index.php?option=com_virtuemart&view=productdetails&virtuemart_product_id=53&virtuemart_category_id=237&Itemid=135
112. **Soto C, Valencia A, Galvis R D y Correa H J 2005.** Efecto de la edad de corte y del nivel de fertilización nitrogenada sobre el valor energético y proteico del pasto kikuyo (*Pennisetum clandestinum*). *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias.* Volume 18 (1): 17 - 26. Retrieved December 10, 2005, from http://rccp.udea.edu.co/v_anteriores/18-3/pdf/18-1-3.pdf.
113. **Spears, J, Hatfield, E 1978.** Nickel for ruminants. Influence of dietary nickel on ruminal urease activity. *J Anim Sci* 47: 1345-1350
114. **Suttle N. 1999.** *The Mineral Nutrition of the livestock* 3rd Edition. Cap 1:14-17
115. **Suttle N. and Field A. 1967** Studies on magnesium in ruminant nutrition," Effect of increased intakes of potassium and water on the

- metabolism of magnesium, phosphorus, sodium, potassium and calcium in sheep. *J. Dairy Sci.* 87:379–385
116. **Tate S. Meister A. 1974.** Interaction of gamma-glutamyl transpeptidase with amino acids, dipeptides, and derivatives and analogs of glutathione. *J Biol Chem.* 1974; 249:7593–7602. [PubMed: 4154944]
 117. **Teeter, R.G., Owens, F.N. and Mader, T.L. 1984.** Ytterbium chloride as a marker for particulate matter in the rumen. *Journal of Animal Science* 58, 465–473.
 118. **Terry, R. A., J.M.A. Tilley, and G. E. Outen. 1969.** Effect of pH on cellulose digestion under in vitro conditions. *J. Sci. Food Agric.* 20:317.
 119. **Tomas F and Potter B. 1976.** The site of magnesium absorption from the ruminant stomach. *Br. Y. Nutr.* (1976), 36
 120. **Thompson G. Meister A. 1974.** Hydrolysis and transfer reactions catalyzed by gamma-glutamyl transpeptidase; evidence for separate substrate sites and for high affinity of L-cystine. *Biochem Biophys Res Commun.* 1976; 71:32–36. [PubMed: 9080]
 121. **Tsubota H. Hoshino S. 1969.** Transaminase Activity in Sheep Rumen Content. *Journal of dairy science* col. 52, no. 12.
 122. **Underwood E. Suttle N. 1999.** The mineral nutrition of livestock 3rd edition. CABI International.
 123. **Valk H. Kogut J. 1998.** Salt block consumption by high yielding dairy cows fed rations with different amounts of NaCl. *Livestock Production Science*, Volume 56, Issue 1, 1 October 1998, Pages 35–42. [http://dx.doi.org/10.1016/S0301-6226\(98\)00145-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0301-6226(98)00145-6).
 124. Valkeners, D., A. The´wis, S. Amant, and Y. Beckers. 2006. Effect of various levels of imbalance between energy and nitrogen release in the rumen on microbial protein synthesis and nitrogen metabolism in growing double-muscled Belgian Blue bulls fed a corn silage-based diet. *J. Anim. Sci.* 84:877–885.
 125. **Van't Klooster A. 1967.** De toestand van calcium, magnesium en enkele andere mineralen in darminhoud en mest van herkauwers in verband met hun resorptie. Mededelingen Landbouwhogeschool, Utrecht University, Utrecht, The Netherlands.

- 126. Van Lier E. Regueiro M. 2008.** Digestión en retículo – rumen. Departamento de producción animal y de pasturas. Curso de Anatomía y Fisiología animal.
- 127. Wacker, W. 1969.** The biochemistry of magnesium. *Annals of the New York Academy of Sciences* 162, 717–726
- 128. Waldron M. Nishida T. Nonnecke B. Overton T. 2003.** Effect of Lipopolysaccharide on Indices of Peripheral and Hepatic Metabolism in Lactating Cows. *Journal of Dairy Science* Vol. 86, Issue 11, Pages 3447-3459
- 129. Weimer P. Waghorn G. Odt L. Mertens D. 1999.** Effect of Diet on Populations of Three Species of Ruminal Cellulolytic Bacteria in Lactating Dairy Cows. 1999 *J Dairy Sci* 82:122–134
- 130. Wilye M. Fontenont J. Greene W. 1985.** Absorption of magnesium and other macrominerals in sheep infused with potassium in different parts of the digestive tract. *Journal of animal science*, Vol. 61, No. 5, 1985

CAPITULO 5

EFFECTO DEL CLORURO DE MAGNESIO EN LA DIETA DE VACAS LECHERAS SECAS SOBRE LA ACTIVIDAD RUMINAL *in vivo* DE GAMMA GLUTAMIL TRANSFERASA Y NITRÓGENO UREICO EN SANGRE.

Wilmer A. Cuervo ^a. Héctor Jairo Correa C. ^{ab}

- c. Grupo de investigación en interacciones nutricionales, metabólicas y reproductivas ganado lechero.
- d. Departamento de producción Animal, Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín

5.1. Resumen.

En el rumen de los bovinos, las aminotransferasas median la incorporación de amonio libre a los microorganismos ruminales. La actividad de este tipo de enzimas puede regular la fijación de nitrógeno a nivel ruminal disminuyendo su excreción. En estas reacciones pueden intervenir diversos cofactores, especialmente metales como el magnesio, que pueden o no potenciar la actividad de aminotransferasas como la gamma-glutamil transferasa (GGT). Con el objetivo de analizar el efecto del nivel de suplementación de magnesio (Mg++) en el metabolismo nitrogenado del rumen, se utilizaron 12 vacas Holstein con 635±10 Kg de peso vivo y 5 años de edad, que fueron alimentadas con pasto estrella (Cynodon nlemfuensis) a voluntad en su último tercio de la gestación, ubicadas en el municipio de Aratoca (1803 msnm, 17°C) Santander, Colombia. Los animales fueron asignados de manera aleatoria a uno de 3 niveles de adición de cloruro de magnesio MgCl₂ en la dieta (T0 0g, T1 150gr y T2 300gr), suministrada en 2 raciones diarias junto con 0,8 Kg de concentrado comercial de contenido mineral conocido. El experimento tuvo una duración de 21 días con un periodo de adaptación previo de 7 días. Se obtuvieron muestras de líquido ruminal (LR) los días 0, 7, 14 y 21 utilizando la técnica de la sonda oro-ruminal y de sangre por medio de punción de la vena coccígea para la determinación de nitrógeno ureico en sangre (NUS). Para la determinación de la actividad de la GGT en LR y de urea en sangre se utilizaron kits comerciales. Para las variables evaluadas se utilizó un diseño completamente al azar con arreglo de medidas repetidas en el tiempo mediante el PROC MIXED y el comando LSMEANS del software de análisis estadístico SAS 9.2. Se encontraron interacciones significativas entre la adición de sal y el

tiempo de muestreo sobre la actividad ruminal de GGT y el NUS. En promedio el LR de las vacas del T1 (150g/d MgCl₂) presentó actividad de GGT (492,41±187nKtal/L) significativamente superior (P<0,01) durante todos los muestreos a la de los otros dos tratamientos. Se evidenció un efecto cuadrático en la GGT al adicionar mayor cantidad de sal de Mg (300g/d) al observarse disminución de su actividad, posiblemente relacionada con una saturación de Mg en el medio líquido del rumen lo que pudo cambiar la disociación del compuesto evaluado (MgCl₂) evitando su acción positiva sobre la enzima. El T2 no fue significativamente diferente al control (276,93±177 y 240,06±160 respectivamente) a lo largo del experimento. Se observó un comportamiento similar en el nivel de NUS del T1 (8,12mg±0,95 mg/dL) al ser significativamente inferior al control y a T2 (12,6±0,29 y 12,3±3,3 respectivamente) en todos los días de muestreo (p<0,0001). Al igual que con la GGT, el nivel de NUS disminuyó constantemente durante tres semanas y se estabilizó hacia el final del experimento. La coincidencia en el aumento de la GGT en rumen y la disminución en el NUS de los animales del T1 evidencian la relación de esta enzima con el metabolismo nitrogenado en rumiantes. La suplementación de sales de Mg en dosis de hasta 300gr/d no presentó inconvenientes en el desempeño de animales preparto, sin embargo presentó problemas de palatabilidad por ser un material astringente. La suplementación diaria de 150g/d de MgCl₂ por animal potenció de mayor forma la actividad de la aminotransferasa de interés en el metabolismo nitrogenado para los rumiantes. Es posible afirmar que un aumento en la actividad de aminotransferasas como la GGT está relacionado con una disminución en NUS. Se recomienda la continuación de este trabajo con la medición de producción de amonio y excreción de N en orina y heces.

Palabras Clave: Transaminasa, trópico alto, iones divalentes, nitrógeno no proteico, Sales de magnesio.

Abstract

In the rumen of cattle, aminotransferases mediate incorporation of free ammonia to rumen microorganisms. The activity of such enzymes can regulate nitrogen fixation in the rumen reducing its excretion. In these reactions may

involve various cofactors, especially metals such as magnesium, which may or may not enhance the activity of aminotransferase and gamma-glutamyl transferase (GGT). In order to analyze the effect of level of supplementation of magnesium (Mg^{++}) in the nitrogen metabolism of rumen, 12 Holstein cows (635 ± 10 kg body weight and 5 years of age) were fed star grass (*Cynodon nlemfuensis*) ad libitum in the last third of gestation, located in the town of Aratoaca (1803 m, $17^{\circ}C$) Santander, Colombia. The animals were randomly assigned to one of 3 levels of addition of magnesium chloride ($MgCl_2$) in the diet (0g TO, T1 and T2 150g 300g), provided in 2 portions daily with 0.8 kg of commercial concentrate of mineral content known. The experiment lasted 21 days with a period of 7 days prior adaptation. Samples of ruminal fluid (RL) on days 0, 7, 14 and 21 were obtained using the oro-ruminal probe technique and blood by puncturing the coccygeal vein for the Blood ureic nitrogen (BUN) determination. For determination of the activity of GGT in RL and blood urea commercial kits were used. For the evaluated variables we used a completely randomized design under repeated measures in time by using the PROC MIXED command LSMEANS and statistical analysis software SAS 9.2. Significant interactions between the addition of salt and the sampling time on ruminal activity of GGT and BUN were found. On average RL from T1 Cows (150g / d $MgCl_2$) presented significantly higher GGT activity ($492.41 \pm 187nKtal/L$) ($P < 0.01$) for all samples to that of the other two treatments. A quadratic effect on GGT was evidenced by adding more salt Mg (300g / d) to the observed decreased activity, possibly related to a saturation of Mg in the liquid medium of the rumen which could change the dissociation of the compound evaluated ($MgCl_2$) avoiding positive action on GGT. T2 was not significantly different from control ($276.93 \pm 240.06 \pm 177$ and 160 respectively) throughout the experiment. Similar behavior was observed in the level of BUN T1 ($8.12 \text{ mg} \pm 0.95 \text{ mg} / \text{dL}$) to be significantly lower than the control and T2 (12.6 ± 0.29 and 12.3 ± 3.3 respectively) on all sampling days ($p < 0.0001$). As with the GGT, BUN level decreased continuously for three weeks and stabilized by the end of the experiment. The coincidence GGT increased rumen and decreased BUN T1 animals show the relationship of this enzyme with the nitrogen metabolism in ruminants. Supplementation of Mg salts in doses up to 300g/d did not present problems in the performance of prepartum animals;

however palatability problems presented for being an astringent material. Daily supplementation of 150 g/d per animal $MgCl_2$ generated a higher increase in the aminotransferase activity. Therefore, it is possible that the BUN decrease was related to an increase in the GGT activity. It's recommended a continuation of this study to measurement of ruminal ammonium production and excretion of urine and faeces N.

Key words: Transaminase, High tropic, divalent ions, non-protein nitrogen, Magnesium salts.

5.2. Introducción.

El contenido promedio de Mg para el pasto estrella (*Cynodon nlemcfuencis*) oscila entre 0,19%. (González et al 1996, Hernandez et al 2000) y 0,22%, (Sanchez y Soto 1997, 1999) y su consumo puede ser de hasta 2,95% del peso vivo del animal (Greenhalg et al 1966, Greenhalg y Reid 1968, Chandler 1976, Le Du et al 1979, Combellas y Hodgson 1979, Glassey et al 1980, Ruiz et al 1981, Ceballos et al 2002, González et al 1996), lo que en teoría satisface el requerimiento de Mg para bovinos de leche (0,2% de la Materia seca) (NRC 2001). La principal fuente de suplementación de Mg es el alimento concentrado, que aporta cantidades suficientes de Mg a la dieta (Thomas et al 1984). Sales puras (MgO , $MgSO_4$, $MgCl_2$), se han utilizado para corregir el síndrome de depresión de grasa en leche (Xin et al 1980, Erdman et al 1980), mantener el pH ruminal (Schaefer et al 1982) y tratar la hipomagnesemia (Wilson 1980 y Holtenius et al 2008).

Las dosis experimentales reportadas oscilan entre 0,4 y 0,5% en base seca (NRC 2001, Gentry et al 1978) e incluso hasta 0,61% sin reportar efectos negativos (Van Mosel et al 1990). Los reportes de toxicidad por este mineral son bajos ya que no existe un mecanismo de control metabólico del Mg (Underwood y Suttle (1999), y los procesos para su absorción (el pasivo no saturable y el activo saturable) parecen depender más de la concentración de K en el medio que del mismo Mg en el forraje (Roth y Werner 1979, Martens 1983).

Se ha reportado que el Mg funciona como cofactor de transaminasas como la GGT y la glutamato deshidrogenasa (GDH) (Faixova y Faix 2002, Faixová et al 2006) enzimas que permiten la fijación de amonio ruminal, una forma de nitrógeno no proteico. Las bacterias ruminales son capaces de convertir NNP en aminoácidos, por medio de la GDH que adiciona amonio NH_4^+ a una molécula de α -ceto-glutarato (Marques 1988). También la glutamina sintetasa (GS) incorpora NH_4^+ a una molécula de glutamina. El aminoácido resultante de cualquiera de las dos vías enzimáticas, puede ser incorporado a la proteína que compone a los microorganismos ruminales (Hoshino et al 1996, Van Soest 1994). La GGT por su parte, controla la transaminación de un cetoacido, transfiriendo péptidos y aminoácidos a través de membranas biológicas incluyendo la de microorganismos (Nakayama et al 1994). Las reacciones de esta vía metabólica constituyen un ciclo "gamma-glutamil", siendo su principal función es la de dividir la molécula del Glutathion en sus aminoácidos constituyentes a nivel de la membrana celular y transportar los mismos hacia el citoplasma (Whitfield 2001).

Al interior de las células, la GGT separa los aminoácidos importados en un aminoácido que contiene un residuo gamma glutamil (GGAA) y una molécula de cisteinil glicina (Rodwell y Kenelly 2003). El GGAA puede ser posteriormente convertido a glutamato y glutamina. El glutamato, juega un papel central en el metabolismo del N en mamíferos superiores y microorganismos ya que una de sus funciones es ser receptor de grupos aminos (NH_2^-) (Chen y Russell 1989, Paster et al 1993, Nelson y Cox 2001, Pabón 2004). Se ha postulado que la concentración de GGT puede regular el *pool* intracelular de glutamato en bacterias ruminales (Faixová et al 2006) pudiendo mejorar la utilización de N en especial la de NNP (Faixová y Faix (2005).

La utilización de N a nivel ruminal ha sido estrechamente relacionada con el nivel de NUS (Kohn et al 2005, Correa et al 2011). A nivel experimental se ha determinado que el amonio ruminal está íntimamente ligado con el nivel de nitrógeno ureico en sangre (Preston et al 1961, Preston et al 1964, Ropstad et al 1989, Gustafsson y Palmquist 1993). Tanto el NUS ($r^2=0,98$) como el nitrógeno ureico en leche (NUL) ($r^2=0,59$) están relacionados con el contenido

de proteína cruda en la dieta y su utilización (Preston et al 1964, Broderick 1995, Roseler et al 1993, Socha et al 2005). Un exceso de proteína dietaria puede generar en rumiantes un exceso de urea exportada al hígado y excretada por orina y leche (Jordan et al 1983, Van Soest 1994, Jonker et al 1998, Annison y Briden 1999).

La eficiencia en el uso de N a nivel ruminal depende de; el tipo de poblaciones bacterianas (Hungate 1968, Goat et al 1998, Fernando et al 2010), el nivel de acidez ruminal (Preston et al 1964, Van Soest 1994, Veth et al 1999, Pan et al 2003) y la disponibilidad de sustratos como los carbohidratos no estructurales (CNE) para la formación de proteína bacteriana (McLaren 1964, Alison 1969). Animales alimentados con un bajo aporte de granos y alto de forraje fibroso (<2 Mcal EM /Kg de MS) han mostrado un aumento en las poblaciones de bacterias fibrolíticas (Fernando et al 2010, Weimer et al 1988) que pueden utilizar al amonio como su única o principal fuente de N para crecer (Bryant y Robinson 1962, Allison 1969, Van Soest 1994).

En algunas explotaciones las vacas secas en último tercio de gestación consumen forrajes fibrosos e incluso en mal estado de almacenamiento (García 2009), de tal manera que el aporte de almidón y otros azúcares rápidamente fermentables, puede ser muy bajo, pudiendo reducir drásticamente la síntesis de proteína microbiana (Annison y Briden 1999). Sin embargo, tanto la disponibilidad ruminal de N como su utilización se esperan bajas durante este estado fisiológico, especialmente bajo las condiciones de manejo de las lecherías tradicionales del país. Por ello, el objetivo de este trabajo fue, evaluar el efecto de la suplementación de una fuente inorgánica de Mg de alta disponibilidad ($MgCl_2$) a vacas en su último tercio de gestación consumiendo praderas de pasto estrella sobre la actividad ruminal de la GGT y la concentración de urea en sangre.

5.3 Materiales y Métodos.

5.3.1 Localización

El trabajo de campo se llevó a cabo en la Finca San Sebastián ubicada en el municipio de Aratoca (6° 41' 0" N, 73° 1' 0" W) (GeoHack 2013), departamento de Santander a 2200 msnm (IGAC 1996), con una temperatura promedio de 19°C, 58% Humedad relativa (Guhl 2009) y perteneciente a una zona ecológica de Bh-pM (Holdridge 1996). La finca contaba con praderas de pasto estrella (*Cynodon nlemfuensis*) fertilizado con pollinaza a razón de 200 Kg /Ha/ año.

5.3.2 Animales experimentales

En el estudio se utilizaron 12 vacas raza Holstein adultas (5 años promedio) con un peso de 635±10 Kg. Se realizó un examen de palpación rectal para confirmar la etapa de gestación de las vacas, de tal forma que todas estuvieran dentro del último tercio de gestación (196±33d). Los animales se mantuvieron en pastoreo constante de pasto estrella y para el manejo de la toma de muestras eran trasladados a las 08:00 a un establo con piso de cemento y un brete para facilitar su manejo (Ver imagen 5.1).

5.3.3. Dieta y suplementación

Los animales fueron asignados aleatoriamente a tres tratamientos experimentales (4 vacas/tratamiento) consistentes en el suministro de 0, 150 y 300 g/d de MgCl₂, distribuidos en dos raciones diarias (08:00 y 14:00). Debido a que el MgCl₂ generaba astringencia en los animales (por su baja palatabilidad), el mismo fue mezclado con 0,8 kg de un suplemento comercial (Solla®). Para ello se implementó un periodo de adaptación al consumo de la sal consistente en el suministro creciente de la misma y del suplemento comercial como se muestra en la Tabla 5.1. Posteriormente, las dietas experimentales se mantuvieron durante 21 días. Las vacas que no recibieron la sal, también fueron suplementadas con el alimento comercial.

Imagen 5.1. Establo de Manejo para toma de muestras



Tabla 5.1. Esquema de suplementación en Periodo de Adaptación.

Día	Tratamiento*			
	150 g/d		300 g/d	
	MgCl ₂ (g)	Concentrado (g)	MgCl ₂ (g)	Concentrado (g)
-7	20	400	50	400
-6	20	600	80	600
-5	30	600	130	600
-4	50	600	180	600
-3	70	700	210	700
-2	90	700	270	700
-1	120	800	300	800
0	150	800	300	800

*Los animales del tratamiento control (0 g/d) recibieron la misma cantidad de alimento concentrado que los demás animales

Tabla 5.2. Composición Nutricional Concentrado comercial SOLLALECHE 18 ®

Nutriente	Unidad	Cantidad
Materia Seca	%	86,9
Extracto Etéreo	%	3
Proteína Cruda	%	18
NNP max*	%	3
Fibra Cruda	%	15
FDN	%	31,2
FDA	%	12,6
Energía neta de lactancia (ENI)	Mcal/Kg MS	1,7
Cenizas	%	10
Ca	%	2
P	%	0,5
Mg	%	0,57
K	%	0,5

*NNP= Equivalente proteico del nitrógeno no proteico

Fuente: <http://www.solla.com>

Todas las vacas se mantenían bajo pastoreo de praderas de pasto estrella (Tabla 5.2), disponían permanentemente de agua a voluntad y no recibieron ninguna adición de sal mineralizada

Tabla 5.3 Composición Química Pasto Estrella (*Cynodon nlemfuencis*)*

Componente	Unidad	Cantidad
Materia Seca	%	31,8
Cenizas	%	6,50
Proteína Cruda	%	8,34
Extracto Etéreo	%	0,85
FDN	%	71,18
FDA	%	45,43
Fibra cruda	%	20,33
Ca	%	0,37
P	%	0,30
Mg	%	0,21
K	%	1,41

* Proveniente del municipio de Aratoca – Santander (45 días de rebrote)
Fuente: Laboratorio de Bromatología - Universidad Industrial de Santander

Imagen 5.2. Mezcla concentrado comercial y $MgCl_2$



- a) Pesaje del $MgCl_2$ en balanza de precisión
- b) Pesaje alimento concentrado
- c) Mezcla de las 2 raciones diarias para cada animal experimental
- d) Suministro individual de la dieta experimental

5.3.4 Toma de muestras.

Se tomaron muestras de licor ruminal (LR) los días 0, 7, 14 y 21 del periodo experimental utilizando el procedimiento descrito por Martin et al (2005) con algunas variaciones: en lugar de utilizar un tapón rígido en los últimos 20 cm de

la manguera, se utilizó un tapón compuesto de pan (completamente degradable a nivel ruminal). De igual forma solo se utilizaron aproximadamente 3 metros de manguera plástica con 2,5mm de grosor, la cual fue acoplada a un recipiente plástico de almacenamiento, el cual a su vez fue conectado con 2 metros de manguera similar a la de la sonda, a un equipo de succión mecánica (Aspiradora) (ver Imagen 5.3).

Los animales permanecieron 12 horas sin recibir alimentos antes de colectar el LR con la finalidad de reducir la capa de forraje y facilitar el ingreso de la sonda al interior de contenido ruminal ya que en ensayos previos, la obtención del LR fue muy limitada. Martín et al (2005) sugieren ayunos de más de 12 horas que para los fines de este trabajo, se consideraron excesivos. Luego de ser inmovilizadas en el brete, las vacas fueron sedadas con Rompun® (Hidróxido de xylacina) en una dosis de 0,01 mg por kg de peso vivo, se esperaron cerca de 10-15 minutos, se procedió a utilizar un abre bocas de caucho y se introdujo la sonda de manera continua y cuidadosa permitiendo al mismo tiempo avance y retroceso de la misma.

Luego que la sonda avanzaba entre 1,9 y 2,3 mt se procedía a expulsar el tapón de masa de pan mediante una presión de aire fuerte y rápida, a continuación la sonda se conectaba a la bomba de vacío para aspirar fluido ruminal (FR) (aproximadamente 30 mL). Dicho FR fue filtrado a través de 4 capas de papel filtro para obtener aproximadamente 20mL de LR que fue almacenado en frascos individuales, y mezclado con 0,1mL de ácido sulfúrico al 50%. Todos los frascos fueron empacados en una cava con hielo y

trasladados al laboratorio de Nutrición animal de la Universidad Cooperativa de Colombia sede Bucaramanga donde fueron mantenidos en congelación (-20°C) hasta su posterior análisis.

Imagen 5.3 Materiales y ensamble bomba succión para la obtención de LR



- a. Recipiente de colecta de LR con tubo de ingreso del líquido (Blanco) y de succión (Negro)
- b. Acople de la sonda al recipiente de colecta
- c. Acople del recipiente de colecta a la bomba de succión mecánica (aspiradora)
- d. Introducción de la sonda con ayuda de nariguera y abreboza de caucho
- e. Contenido ruminal en la sonda

Simultáneamente con la toma de muestra de LR, se tomaron muestras de sangre mediante punción de la vena coccígea, aproximadamente 5 cm debajo de la base de la cola, utilizando un Vacutainer serum (Ref N° 367844). Se obtuvieron 10 mL de sangre con anticoagulante (EDTA y fluoruro de sodio) e igual cantidad de sangre sin anticoagulante. Las muestras fueron almacenadas en una cava con hielo y transportadas desde la finca al Laboratorio de Nutrición Animal UCC (Bucaramanga). En el laboratorio, las muestras fueron

centrifugadas a 3000 rpm durante 12 minutos para separar el suero y el plasma, este se envasó en tubos micro-viales, los cuales fueron marcados y almacenados a -20°C hasta su posterior análisis.

Debido a que el manejo nutricional que se llevaba a cabo en la finca durante la lactancia, incluía una suplementación *ad libitum* de pollinaza antes del ordeño, se ordenó por parte del veterinario la suspensión de esta adición desde un mes antes del inicio del experimento. Esto debido a que el elevado contenido de NNP presente en este suplemento (Cocuh 1972, Duarte et al 1996, Lema et al 2012) habría podido elevar los niveles de NUS en los animales experimentales, generando alteraciones en el nivel inicial del metabolito y con ello el análisis estadístico.

5.3.4.1 Consideraciones y observaciones para la obtención de líquido ruminal por sonda oro-ruminal

Se realizó seguimiento del desempeño de cada animal durante y después del parto y no se encontraron dificultades o procesos abortivos previos al mismo. Otros autores han trabajado con dosis bajas de hidroxicloriguro de xilacina en vacas preparto, Damir et al (1994) utilizaron 0,035 mg/Kg en vacas lecheras durante los últimos 28 días preparto. De la misma forma Smith et al (2009) utilizaron 0,03 mg/Kg en vacas adultas en preparto tardío sin reportar efectos secundarios en los animales. Auchtung et al (2005) por su parte utilizaron hasta 0,045 mg/Kg del mismo producto en vacas durante las últimas 8 semanas preparto sin reportar abortos o problemas en el periparto.

No se presentó ninguna complicación con el paso de la sonda oro-ruminal en los animales experimentales. Sin embargo para el primer muestreo en dos animales del grupo control, la dosis de sedante no tuvo el efecto esperado por lo que el proceso de extracción tomó más tiempo de lo previsto (30 min) y se tuvo que aplicar una segunda dosis a menor concentración (0,0025 mg/Kg PV). Las muestras de CR obtenidas estaban libres de saliva u otros residuos que pudieran alterar las condiciones normales del medio ruminal. El filtrado del CR permitió la obtención de LR con volúmenes que variaron entre 10mL y 45mL.

A pesar de no utilizar en la sonda la manguera interna descrita por Martin et al (2005) no se tuvieron problemas para la obtención de CR de buena calidad y en cantidad suficiente para ser filtrado. No obstante, al final de cada muestreo la manguera utilizada había perdido rigidez y estructura por lo que para cada muestreo se debió utilizar una nueva. Se evitó al máximo la contaminación o mezcla de CR provenientes de diferentes animales al realizar dos lavados con agua de grifo, uno con jabón comercial diluido y dos más con agua de grifo a presión.

Con el objetivo de evitar que el recipiente de colecta tuviera contacto directo con el CR, en el momento en que se observaba el paso del mismo por la sonda, se procedía a desconectar el equipo de succión y se desconectaba la sonda del recipiente, de tal forma que el CR era depositado directamente en el papel filtro.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en pruebas *in vitro* anteriores (ver capítulo 2) el LR fue descongelado a temperatura ambiente y se utilizó sin centrifugar para evitar cambios importantes en la actividad ruminal de GGT.

5.3.5 Análisis de Laboratorio

5.3.5.1. Determinación de Actividad Enzimática GGT en LR.

Las muestras de LR fueron descongeladas a temperatura ambiente y utilizando una micro-pipeta graduada se obtuvieron 1000 μ L de LR. Para su posterior análisis se utilizó el kit colorimétrico GAMMA GLUTAMYL-TRANSFERASE de Byosystems® (código 12520), el cual se basa en la velocidad de formación de 3-carboxi-4-nitroanilina a partir de la transferencia del grupo γ -glutamilo de la γ -glutamil-3-carboxi-4-nitroanilida a la glicilglicina.

Para este método colorimétrico se manejó un espectrofotómetro GENESYS 10S UV-Vis, en el que se registró la absorbancia de las muestras a 405nm. En cada celda se incluyeron 500 μ L de reactivo de trabajo, 500 μ L de agua destilada y 1000 μ L de LR. Para cada muestra se realizó una lectura cada

minuto durante tres minutos, estos datos fueron utilizados para establecer la diferencia (Δ) de absorbancia, la cual fue ingresada en la siguiente ecuación:

Ecuación 5.1. Determinación de la actividad enzimática

$$\Delta A / \text{min} \quad x \quad \frac{V_t * 10^6}{\epsilon * I * V_s} = U / L$$

Kit No 11520 Byosistemas ®

Dónde:

$\Delta A/\text{min}$ = Diferencia promedio entre lecturas de absorbancia

V_t = volumen total de la reacción (1,1)

ϵ = Coeficiente de absorción molar de 3-carboxy-4nitroanilina a 405nm (9900)

I = el paso de la luz (1cm)

V_s = Volumen de la muestra (0,1)

La actividad enzimática fue expresada en nKtal/L de acuerdo a las recomendaciones estipuladas en el kit comercial.

5.3.5.2. Determinación de NUS

La determinación del nitrógeno ureico en sangre (NUS) se realizó al día siguiente del último muestreo (día 30 del experimento). Los micro-viales fueron descongelados en un baño de maría a 39°C. Utilizando una micro-pipeta graduada, se obtuvieron 10µL de muestra (plasma sanguíneo centrifugado) para ser analizada por medio del kit espectrofotométrico UREA/BUN de BioSystems® (código 11536). Se realizaron lecturas de absorbancia a 600nm en un espectrofotómetro marca GENESYS 10S UV-Vis. El método para la determinación de la concentración de NUS (mg/dL) se muestra a continuación:

Ecuación 5.2. Determinación concentración de Nitrógeno ureico

$$\text{Concentración (mg/dL)} = \frac{\text{Absorbancia de Muestra}}{\text{Absorbancia Patrón de Urea}} * 23,3$$

Fuente: Kit UREA/BUN 11537 Biosystems

La celda que contenía el patrón de la urea contenía 10 μ L del reactivo patrón y 2 mL del reactivo de trabajo y la lectura de su absorbancia se realizó solo una vez, mientras que la celda del blanco únicamente contenía los 2 mL del reactivo de trabajo y su absorbancia era registrada antes de cada serie de lecturas.

Imagen 5.4 Muestreo Sanguíneo y determinación de NUS



- a. Desinfección de la zona coccígea
- b. Toma de sangre con vacutainer
- c. Almacenamiento del suero lácteo posterior al calentamiento, coagulación y centrifugación
- d. Almacenamiento (-20°C) muestras de LR, Plasma sanguíneo y Leche
- e. Toma de muestras con micro-pipeta
- f. Determinación NUS y NUL por medio del kit 11536 Biosystems®

5.4 Análisis estadísticos.

Para evaluar el efecto de la suplementación con el MgCl₂ sobre la actividad enzimática de la GGT en LR y el nivel plasmático de NUS, los resultados se analizaron bajo un diseño completamente al azar con medidas repetidas en el tiempo utilizando el PROC MIXED del paquete estadístico SAS 9.2 (2002).

Tanto para los datos de la actividad ruminal de GGT como para el nivel de NUS, el análisis estadístico siguió este modelo:

$$Y_{ij} = \mu + M_i + T_j + MT + \varepsilon_{ijk}$$

Donde:

Y_i = Actividad ruminal de la GGT

μ = Efecto de la media poblacional

M_i = Efecto del i-ésimo Nivel de Mg suplementado

T_j = Efecto del j-ésimo tiempo de medición

ε_{ijk} = Efecto del error experimental

5.5. Resultados y discusión.

5.5.1 Actividad ruminal de GGT.

El análisis estadístico permitió establecer la existencia de una interacción entre el tratamiento y el tiempo de muestreo ($p < 0,006$) sobre la actividad de la GGT, en el que el suministro de 150g/d de $MgCl_2$ generó una actividad para esta enzima que superó en más del doble la actividad observada en el T0 y casi el doble de la observada en T2 (Gráfica 5.1). No se observaron diferencias significativas ($p = 0,74$) entre la actividad de GGT registrada para el T2 y el T0 en ninguno de los periodos evaluados. Faixová y Faix (2002) al adicionar $MgCl_2$ en LR de ovejas reportan una actividad *In vitro* superior (1400 nKtal/L) a las observadas en este trabajo. Sin embargo, posteriormente Faixová et al (2006) trabajando bajo condiciones experimentales idénticas a las de su anterior trabajo, observaron resultados contradictorios, en los que, bajas adiciones *In vitro* de Mg aumentaron la actividad normal de la GGT en LR, mientras que altas concentraciones de Mg (20×10^{-3} mol/L) la disminuyeron (hasta en 30%). Los autores no explicaron estos resultados.

Los reportes de actividad enzimática en tejidos y fluidos corporales de bovinos varía ampliamente y están relacionados principalmente con la ubicación anatómica, siendo los tejidos y órganos de transporte los de mayor actividad registrados (ver tabla 5.4). Existen algunos factores relacionados con la baja actividad GGT en rumen observada en el presente estudio cuando se comparan con los reportados por Faixova y Faix (2002), Faixová et al (2006). Entre estos estarían las condiciones ruminales de pH (Joyner y Baldwin 1966,

Tate y Meister 1974, Thompson y Meister 1976, Brod et al 1982), el tipo de dieta (Dehority y Orpin 1997, Weimer et al 1999, Giri et al 2005), las poblaciones de microorganismos en rumen (Hobson y Stewart 1997), la especie animal (Van Lier y Regueiro 2008, Fraga et al 2012, Saro et al 2012) y la técnica para la obtención del LR (Martin et al 2005).

Tabla 5.4. Valores de la actividad de GGT ($\mu\text{Ktal/L}$) en tejidos y fluidos corporales de rumiantes.

Especie	Fluido / tejido	Manejo / Modelo animal	n	GGT*	Autores
	LR			1,10	
Ovina	LR <i>In vitro</i> + Mg	Hembras Canuladas	8	1,50	Faixova y faix 2002
	LR <i>In vitro</i> + Mg	Forraje: concentrado (70:30)	6	1,43	Faixova et al 2006
Ovina	suero	Machos y hembras edades diferentes	84	0,38	Malherbe et al 1977
Bovina	suero	Promedio de 25 estudios	>2800	0,24	Braun et al 1983
Bovina	suero	Machos Adultos holstein	65	0,26	Frahm et al 1978
Bovina	sangre	Machos Adultos Frison	111	0,18	Unglaub et al
	suero			0,31	
	rumen			0,012	
	omaso	Machos Adultos Frison	10	0,002	Rico et al 1977
Bovina	abomaso			0,003	
	riñón			1,00	Rico et al 1977
Bovina	LR <i>In vitro</i>	Hembras Holstein adultas		0,28	
Bovina	LR <i>In vitro</i> + Mg	canuladas 100%	4	0,40	
Bovina	LR <i>In Rumen</i>	Forraje (kikuyo)		0,12	Cuervo 2011
Bovina	LR <i>In Rumen</i> + Mg			0,46	
Bovina	LR <i>In vivo</i>	Hembras Holstein adultas canuladas. Forraje:		0,24	
Bovina	LR <i>In vivo</i> +Mg	concentrado (96:4) (Estrella)	4	0,49	Cuervo 2012

LR= Líquido ruminal

* $\mu\text{Ktal/L}$

La interacción entre el tratamiento experimental y los tiempos de muestreo evidenció que la GGT del T1 en el día 0 fue significativamente menor a las demás actividades en el mismo tratamiento a lo largo del periodo experimental ($p < 0,006$). Sin embargo, todos los tratamientos iniciaron el estudio con actividades enzimáticas similares. A partir del segundo muestreo, el LR del T1 mostró un aumento importante y estadísticamente significativo en la actividad

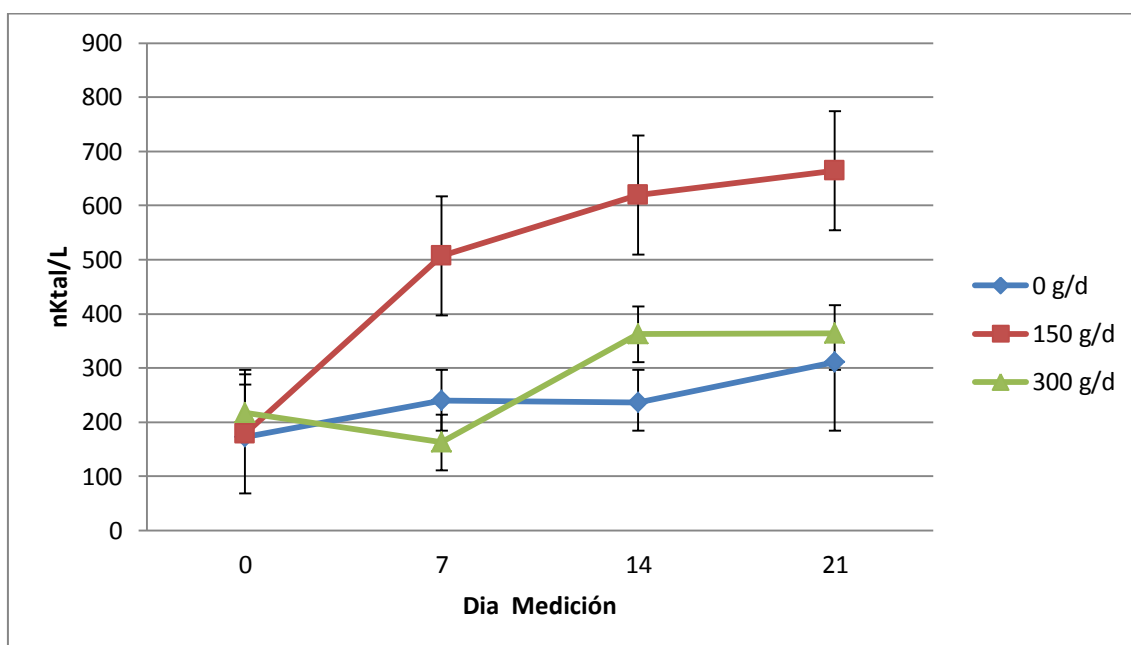
GGT con respecto al LR control (T0) y el T2 (Ver Grafica 5.1). Estas observaciones indican que no solamente esta enzima es detectable en el líquido ruminal (Faixová y Faix 2002) sino que, además, responde a la adición de iones de Mg de manera notable bajo condiciones *in vivo*. De hecho, algunos autores han evaluado la actividad de esta enzima en cultivos de bacterias anaeróbicas tales como *Proteus mirabilis* (Nakayama et al, 1984), *Helicobacter pylori* (McGovern et al 2001) y en *Saccharomyces cerevisiae* (Braga et al 2009).

El incremento significativo de la GGT ruminal con suplementación con 150 g MgCl₂, se observó hasta el día 14 cuando se estabilizó ya que no se observó un incremento adicional al día 21. Esto es bien importante ya que estaría sugiriendo que las poblaciones microbianas requieren de un periodo relativamente largo antes de estabilizar la respuesta a la adición de este tipo de sales. Los resultados obtenidos en este experimento varían con respecto a los estudios de infusión de MgCl₂ via canula ruminal, teniendo en cuenta que en el presente experimento se utilizaron cantidades superiores de sal (53g Vs 150g). Adicionalmente la toma de las muestras se realizó 12 horas después de la última suplementación de Mg, razón por la cual la medición inicial de la actividad de GGT no difirió entre tratamientos. De igual forma, los resultados del presente trabajo indican que la suplementación diaria de MgCl₂ puede generar un efecto acumulativo en el pool ruminal de Mg lo cual se evidencia por la actividad creciente de GGT en LR.

En principio, no hay elementos suficientes para explicar satisfactoriamente este comportamiento diferente a una posible adaptación de la poblaciones microbianas a los efectos tanto químicos (cambios en el pH y fuerza iónica), físicos (presión osmótica) como metabólicos generados por el MgCl₂ adicionado al rumen de estos animales. Esto se debe a que no existen reportes en los que se haya realizado un seguimiento a la respuesta de la GGT ruminal frente a la suplementación de alguna fuente inorgánica de Mg. Faixová et al (2006) midieron la actividad de esta enzima en el LR de ovejas que habían tenido 40 días de adaptación a la dieta experimental. En este trabajo, dicho periodo fue menor, pero se evaluó durante cuatro periodos de siete días.

Desde el punto de vista práctico, estos resultados se constituyen en un precedente que sugiere que dependiendo del tipo de variable, la respuesta a cambios en las fuentes y/o cantidades de minerales que se utilizan en la suplementación de rumiantes, esta puede tardar algunas semanas. No obstante esto, es importante tener en cuenta que la respuesta en la actividad de la GGT a la suplementación con $MgCl_2$ es muy rápida ya que tanto los trabajos de Faixová et al (2006) y los de Cuervo y Correa (2011b) *In rumen* indicaron una respuesta positiva luego de una hora de adición de esta sal.

Grafica 5.1. Interacción entre la suplementación y el día de medición sobre la actividad de la GGT.



La respuesta en la actividad de la enzima ante la adición de 300 g/d de $MgCl_2$, estaría sugiriendo que no existe una relación directa y constante entre la actividad de esta enzima y la cantidad de Mg disponible en el medio, o que cantidades excesivas del mineral en el medio ruminal pueden inhibir su acción. Estos resultados concuerdan con los reportados por Faixová et al (2006) que al realizar adición de Mg en altas concentraciones (20×10^{-3} mol/L) a LR de ovejas se observó una disminución en la actividad de GGT.

En teoría, el bajo contenido de K (1,41%) en el forraje consumido por los animales, permitiría una absorción de Mg a través de la pared ruminal de aproximadamente 28% (Adediji y Suttle, 1999). De esta forma el Mg dietario y suplementario habría quedado disponible en el medio ruminal.

Al realizar las estimaciones del volumen ruminal (46,35 L) (Johnson et al 1988, Scandolo et al 2007) y de la concentración de Mg en el rumen ($4,6 \times 10^{-3}$ mol/L) (Jittakhot et al 2004, Schonewille 1999, Schonewille et al 2007) se puede esperar que la cantidad de Mg que se haya disuelto en el LR, habría aumentado entre 6 (T1) y 12 (T2) veces la concentración normal de Mg en el rumen.

El aumento en la actividad de la GGT en el LR sin centrifugar puede indicar que esta enzima es sintetizada por los microorganismos presentes en el líquido ruminal. Este fenómeno ha sido reportado por Fraga et al (2013) que observó un mayor recuento de bacterias anaeróbicas en fluido ruminal que en contenido ruminal, específicamente en bacterias celulolíticas. Con respecto a la actividad enzimática de las poblaciones presentes en el fluido, la información es confusa. Tsubota y Hoshino (1969) concluyeron que, en ovejas, la fracción rica en bacterias presentaba una menor actividad de aminotransferasas (GDH), mientras que Bhatia et al (1980) observaron menor actividad de transaminasas en la fracción de protozoarios de la fase líquida del rumen.

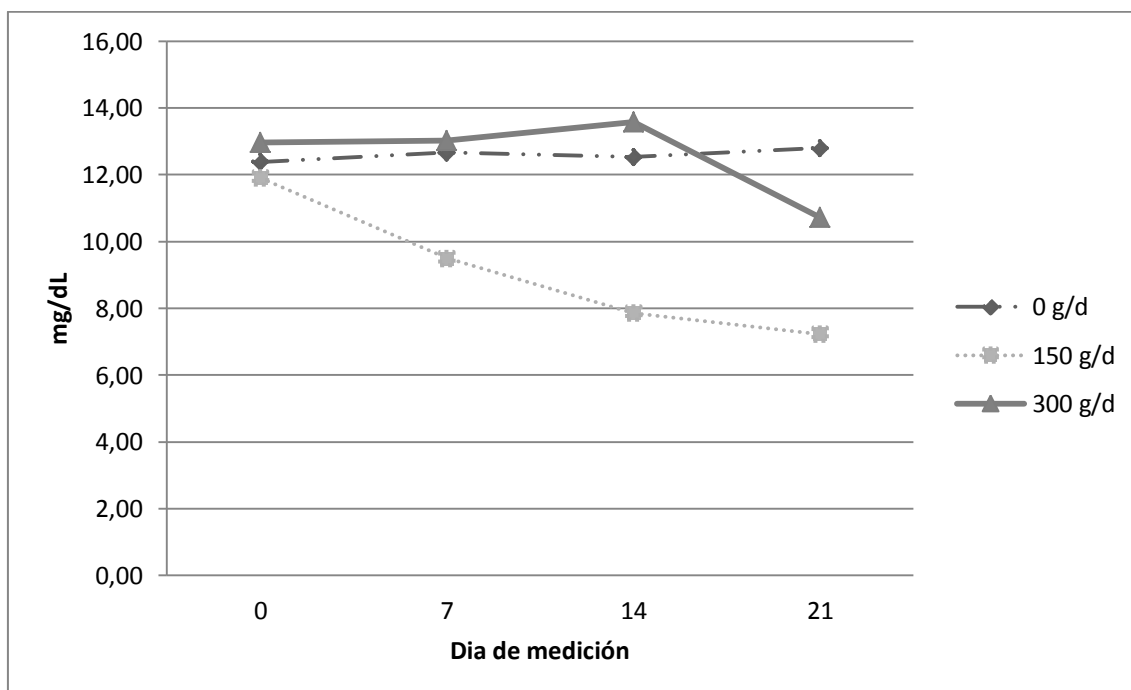
El estudio de la actividad enzimática de cultivos aislados de bacterias ruminales requiere tratamientos físicos drásticos y utilización de soluciones bufferizantes como lo reportaron Chalupa et al (1969) y Baldwin y Palmquist (1964) quienes obtuvieron aislados de bacterias a partir de LR fresco de oveja, luego de dos procesos de centrifugación (320xg por 5 minutos y 2900xg por 30 minutos), suspensiones consecutivas en fosfatos y tratamientos de ultrasonido. En el presente el LR recolectado no fue sometido a ninguno de estos tratamientos por lo que se puede inferir que dicho LR poseía tanto poblaciones bacterianas como de protozoarios.

5.5.3. Nitrógeno ureico en sangre (NUS)

Luego de eliminar dos datos extremos del T2 (que excedían el promedio y una desviación estándar), se encontró efecto de la interacción entre la cantidad de $MgCl_2$ adicionada y el periodo de medición ($p < 0,03$) (Ver grafica 5.2). El promedio general de NUS fue de 11,42mg/dL y el de cada uno de los tratamientos experimentales fue de 12,6 mg/dL (T0), 9,13 mg/dL (T1), 12,54 mg/dL (T2).

El nivel de NUS observado en los tratamientos experimentales fue superior al reportado por pardo et al (2008) (5,9 mg/dL) y Preston et al (1964) (7,8 mg/dL), pero inferior al observado por Leibholz (1969), (31mg/dL) y similar al observado por Vallimont et al (2001) (10 mg/dL), Kanjanapruthipong et al (2010) (9,55mg/dL) y Doepel et al (2002) (11,5mg/dL) al trabajar con vacas preparto.

Grafica 5.2. Interacción entre la suplementación y el día de medición sobre el nivel de NUS.



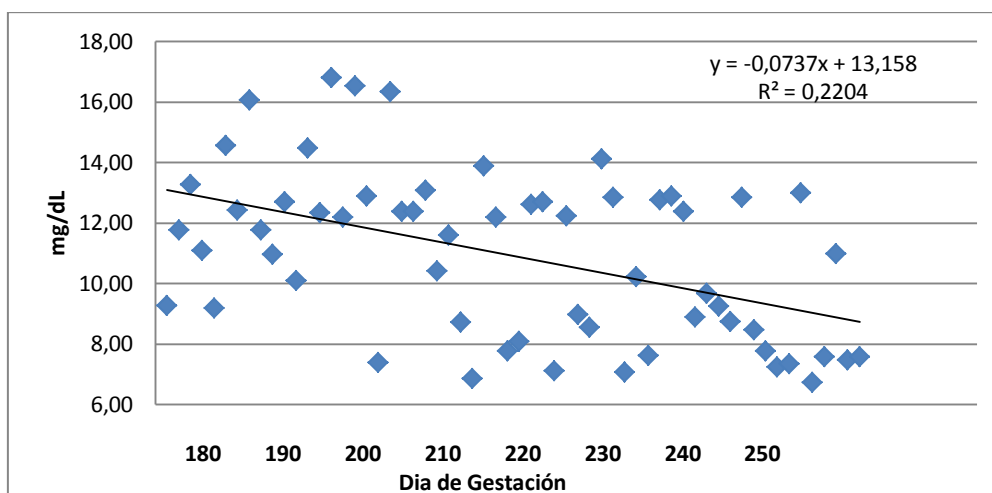
Se observó una disminución continua y significativa en el nivel de NUS proveniente de las vacas del T1 a medida que avanzó el periodo experimental, mientras que los valores del metabolito para las muestras del T0 y T2 no mostraron diferencias significativas en ninguno de los tiempos de medición,

incluso en la última medición en donde a pesar de observarse una leve disminución el nivel del metabolito en el T2, no se evidenciaron diferencias ($p=0,08$).

El promedio general de NUS mostró una ligera tendencia a disminuir ($r^2=0,22$) a lo largo del periodo experimental (Grafica 5.3). En el grupo control el metabolito fue constante ($12,3\pm0,2 - 12,7\pm0,3\text{mg/dL}$), mientras que el T2 ($12,9\pm0,2 - 10,7\pm1,2\text{mg/dL}$) presentó una disminución significativa hacia el final del experimento ($p<0,05$). Exceptuando la primera medición, el nivel de NUS del T1 determinado en los demás días experimentales fue significativamente inferior a los niveles de T0 y T2.

A pesar que los animales del T1 iniciaron el experimento con un menor nivel de NUS que el T0 y el T2 (8,09 Vs 11,54 y 12,16 mg/dL respectivamente), la prueba de medias (Tukey) para los días de muestreo, reveló que no existieron diferencias significativas ($p 0,9$) entre tratamientos en el día 0.

Grafica 5.3. Regresión entre BUN y el Día de medición del periodo experimental.



El comportamiento del NUS en las muestras del T1, coincide con un aumento altamente significativo ($p<0,0001$) observado en la actividad ruminal de GGT en el mismo tratamiento. (Grafica 5.1) y de igual el nivel de NUS disminuyó significativamente hasta al día 14 para luego mantenerse hasta el día 21. Estas correspondencias, pueden indicar el efecto de la enzima sobre el metabolismo

nitrogenado en rumiantes. Wallace y McKain (1996) al igual que Faixová y Faix (2002) reportan el efecto estimulador de iones divalentes (Mn, Co) sobre enzimas relacionadas con el metabolismo ruminal (aminotransferasas). La relación entre la actividad enzimática de transaminasas y minerales, es confirmada por Spears y Hatfield (1978) que observaron disminución en ureasa al adicionar Zn y Cd (iones divalentes) a líquido ruminal. Se ha comprobado que el aumento en la actividad de aminotransferasas (GDH, GGT, ALT, AST) está estrechamente relacionado con una disminución en la producción de amonio ruminal (Pardo et al 2008, Hojman et al 2004, Wattiaux et al 2005) y por tanto de NUS (Preston et al 1964, Butler et al 1996, Broderick y Murray 1997, Jonker et al 2002).

La mayoría de investigaciones que determinan NUS en ganado lechero trabajan con un nivel de EM y PC en la dieta superior al del presente experimento. Hammond (1994) relaciona los excesos de PC con aumento en el nivel de NUS, mientras que Greaney et al (1996) atribuyen este resultado a desbalances en la relación PC: EM (Gustafsson y Palmquist 1993, Pardo et al 2008). Preston et al (1964) observaron bajos niveles de NUS en dietas con altos niveles de energía (1,43Mcal/Kg ENI), lo mismo que Hojman et al (1997, 2004) quienes concluyen que niveles crecientes de EM en la dieta aumentan procesos anabólicos en la flora ruminal, disminuyendo la pérdida de N desde el rumen. Es posible que el bajo contenido de EM la dieta experimental pudiera afectar el nivel de NUS. Además, teniendo en cuenta que en el presente trabajo, el contenido de EM y PC fue idéntico en las tres dietas experimentales, es posible inferir que la relación entre la disminución en NUS observada en el T1 con la adición de $MgCl_2$ se pueda deber a otros factores adicionales al nivel de EM y de PC como la adición de minerales a la dieta (específicamente el Mg), gracias a su papel como cofactores y al consumo de materia seca, que aunque no fue medido en el presente estudio, influye en el metabolismo ruminal gracias a que él mismo modula la cantidad de EM, PC y minerales que llegan al rumen.

5.5.4. Relación entre la actividad ruminal de GGT y de NUS.

Al contrario de lo observado con la adición de 150 de $MgCl_2$, al aumentar la dosis de la sal, el nivel de NUS presentó un comportamiento similar al del T0. Este fenómeno se corresponde con lo observado para la actividad de GGT donde en el T1 se generó un aumento en la actividad de esta enzima, mientras que el T2 no generaron cambios en dicha actividad con respecto al grupo control. Esta coincidencia indica que existe una relación entre el NUS y la actividad de GGT en rumen. Este efecto cuadrático puede estar relacionado con un mecanismo de saturación o incluso de intoxicación en el LR, donde los altos niveles de $MgCl_2$ adicionado (300g/d) podrían haber alterado de tal forma la concentración de Mg en la fase líquida del rumen, que la fuerza iónica de la sal cambió alterando su nivel de disociación (Hofmeister 1888, Skoog y Vest 2002, Willey 2004) lo que pudo evitar la disponibilidad del ion divalente (Mg) para acoplarse a la reacción mediada por la GGT evitando que su actividad aumentara.

La estratégica ubicación de la enzima GGT a nivel intracelular, inter-membranal y extracelular al mismo tiempo ((Taniguchi e Ikeda 1998) así como la reacción que cataliza (Figura 5.3). permite presumir que la adición de $MgCl_2$ y el consecuente aumento en su actividad, haya generado un aumento en la disponibilidad de precursores para la formación de glutamato al interior de las bacterias ruminales (Whitfield 2001). En este sentido, el mayor mecanismo de formación de aminoácidos bacterianos a partir de NNP es la fijación del amonio a moléculas de glutamato por acción de la GDH intracelular (Allison 1969, McLaren 1964, Satter y Slyter 1974, Pan et al 2003) que también es potenciada por la adición de Mg al medio ruminal ((Faixová y Faix 2002, Faixová et al 2006).

El ingreso de amonio a los microorganismos ruminales no es un factor limitante en la formación de aminoácidos bacterianos (Pabon 2004), por tanto el elemento limitante para dicha síntesis puede ser la disponibilidad intracelular de glutamato, la cual es estimulada por la acción de la GGT. De tal manera que este es el punto central en donde las bacterias utilizan moléculas de amonio para procesos de anabolismo de aminoácidos (ayudados por la actividad de la

GGT), disminuyendo su salida del rumen y evitando, por tanto, que dichas moléculas puedan ser convertidas en urea a nivel hepático, lo que aumentaría el nivel de NUS. Van der walt (1993) y Reynolds (1995) concluyeron que todo el amonio producido en el rumen es convertido a urea en el hígado, de tal forma que, tal como se vio en este experimento, es posible que en el rumen de los animales experimentales del T1 una mayor cantidad de amonio haya sido fijada, evitando tanto su salida del rumen como su posterior conversión a urea.

Adicionalmente, algunos autores (Lewis 1957, Huntington 1980, Hammond 1983, 1994, Hof et al 1997 y Schepers y Meijer 1988) han establecido relaciones directas y positivas entre la cantidad de amonio ruminal (AR) producida y exportada desde el rumen y el nivel de NUS. El nivel de NUS en el T1 se mostró cambiante a lo largo del experimento, disminuyendo significativamente ($p < 0,007$) hacia el final del periodo experimental, este comportamiento puede ser reflejo del efecto acumulativo de la suplementación de Mg sobre el nivel de AR y con ello de NUS.

5.6. Conclusiones.

Teniendo en cuenta las condiciones experimentales bajo las cuales se llevó a cabo el presente experimento, se concluye que la técnica oro-ruminal permite la obtención de LR de buena calidad sin precisar de la intervención quirúrgica de animales experimentales. El $MgCl_2$ muestra limitaciones al ser adicionado a la dieta solida por su carácter higroscópico y su efecto astringente sobre el animal. La actividad ruminal in vivo de GGT se asemejó a la determinada previamente a nivel *In vitro* e *In rumen*. La actividad de esta enzima en bovinos sigue siendo inferior a la reportada en ovinos, explicado posiblemente por las variaciones en poblaciones bacterianas y sobre todo con el aporte de CNE en la dieta, lo que cambia el pH ruminal.

Se observó un aumento significativo de la actividad ruminal de GGT al suplementar 150 g/d de $MgCl_2$. Este efecto disminuyó notablemente al aumentar la dosis adicionada, coincidiendo con efectos previamente reportados. El aumento en la actividad de la GGT del T1, coincidió con una

disminución altamente significativa en el NUS del mismo tratamiento, evidenciando la relación de esta enzima con el balance de nitrógeno en rumiantes. Dada la disminución en NUS observada en el experimento y la ubicación celular de la GGT reportada en la literatura, se postula que su principal acción en el metabolismo nitrogenado es la de aumentar los sustratos carbonados al interior de las bacterias ruminales. Este aumento puede ampliar la fijación de amonio en estos microorganismos, de tal forma que el cambio en la fijación pudo disminuir los niveles de NUS, al menos en el T1.

Además de estar influenciado por el nivel de PC y por la relación de PC: EM, se concluye que el nivel de NUS al menos en el último tercio de gestación de vacas Holstein, este metabolito puede ser alterado por la adición de Mg.

El efecto cuadrático observado en el comportamiento de la actividad ruminal de la GGT y el NUS luego de la adición de dosis crecientes de $MgCl_2$ puede estar relacionado con un proceso de saturación de la fase líquida del rumen, en donde cantidades excesivas de la sal (300 g/d) adicionadas a la dieta, alteraron la concentración de Mg y consecuentemente la fuerza iónica del enlace $Mg^{+2} - Cl^{-1}$ lo que alteró su disociación y con ello su acción al potenciar la GGT y el nivel de Urea en sangre.

5.7. Recomendaciones.

Ante la ausencia de valores comparables se recomienda realizar la determinación de NUS durante todo el periodo de transición (pre y post-parto). De igual forma se debe complementar los hallazgos del presente estudio con la medición de AR y N en heces y orina así como los niveles de alantoina como indicador de síntesis microbiana en rumen, para poder analizar el efecto global del Mg sobre el metabolismo nitrogenado en rumiantes.

Debido a la naturaleza del suplemento resultaría interesante comparar el efecto de la adición del mineral en la dieta seca o en el agua de bebida. De igual forma lo más recomendable es que la suplementación de Mg continúe en el posparto, teniendo en cuenta el aumento en el aporte de CNE, energía y PC de la dieta.

Para efectos de practicidad y bienestar animal, se recomienda realizar un estudio comparativo entre la técnica utilizada en el presente experimento y la punción ruminal para la obtención de LR.

Agradecimientos.

El autor del estudio agradece al Dr Héctor Jairo Correa Cardona por el apoyo en la construcción creativa y la base bioquímica del experimento. De igual forma al estudiante de pregrado Santiago Jaramillo por su apoyo logístico. A los estudiantes de MVZ de la Universidad Cooperativa de Colombia Miguel Martínez, Pedro Martínez, German Villamizar y Lindzay Martínez por su apoyo en el trabajo de campo. Así como a Don Reynaldo Hernández, encargado del hato lechero de la Granja San Sebastián del municipio de Aratoca – Santander.

5.8. Bibliografía citada.

1. Adediji, O. and Suttle, N.F. 1999 Influence of diet type, potassium and animal species on the absorption of magnesium by ruminants. *Proceedings of the Nutrition Society* 58, 31A.
2. Allison M. 1969. Biosynthesis of Amino Acids by Ruminal Microorganisms. *J Anim Sci* 1969, 29:797-807.
3. Annison E. Bryden W. 1999. Perspectives on ruminant nutrition and metabolism. II. Metabolism in ruminant tissues. *Nutrition Research Reviews* (1999), 12, 147±177 147
4. Auchtung T. Rius A. Kendall P. McFadden T. Dahl G. 2005. Effects of Photoperiod During the Dry Period on Prolactin, Prolactin Receptor, and Milk Production of Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*, Volume 88, Issue 1, January 2005, Pages 121–127

5. Baldwin R. Palmquist D. 1965. Effect of Diet on the Activity of Several Enzymes in Extracts of Rumen Microorganisms. *Applied Microbiology*, March, 1965. Vol. 13, No. 2.
6. Bhatia S. Pradhan K. Singh R. 1980. Ammonia Anabolizing Enzymes in Cattle and Buffalo Fed Varied Nonprotein Nitrogen and Carbohydrates. 1980 *J Dairy Sei* 63:1104—1108.
7. Bonanno A., Todaro M., Di Grigoli A., Scatassa M. L., Tornambè G. and Alicata M. L. 2008. Relationships between dietary factors and milk urea nitrogen level in goats grazing herbaceous pasture. *Ital. J. Anim. Sci.*, 7: 219- 235
8. Braga P. Mannarino S. Eleutherio E. 2009. Glutathione and gamma-glutamyl transferases are involved in the formation of cadmium–glutathione complex. *FEBS Letters*, Volume 583, Issue 9, 6 May 2009, Pages 1489–1492. <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2009.03.066>
9. Brod D. kolsen K. Brent B. 1982. Effect of Water Temperature in Rumen Temperature, Digestion and Rumen Fermentation in Sheep. *J ANIM SCI* 1982, 54:179-182.
10. Chalupa W. Clarck J. Opliger P. Lavker R. 1969. Ammonia Metabolism in Rumen Bacteria and Mucosa from Sheep Fed Soy Protein or Urea. *J. Nutrition*, 100: 161-169.
11. Chandler V.J. 1976. Meat and milk production from intensivity managed tropical grassland in Puerto Rico. En: *Seminario Internacional de Ganadería Tropical*. FIRA-Banco de México. Secretaría de Agricultura y Ganadería. Acapulco, México. p. 221.
12. Chen G. Rusell J. 1989. More Monensin-Sensitive, Ammonia-Producing Bacteria from the Rumen. *Applied And Environmental Microbiology*, May 1989, p. 1052-1057 Vol. 55, No. 5
13. Chester-Jones, H., Fontenot, J.P., Veit, H.P. and Webb, K.E. (1989) Physiological effects of feeding high levels of magnesium to sheep. *Journal of Animal Science* 67, 1070–1081.
14. Combellas J. Hodgson J. 1979. Herbage intake and milk production by grazing dairy cows. 1. The effect of variation in herbage mass and daily herbage allowance in short-term trial. *Grass and Forage Science*. 34:209.

15. Correa H.J. 2007; Cinética de la liberación ruminal de macrominerales en pasto kikuyo (*pennisetum clandestinum*) cosechado a dos edades de rebrote. *Livestock Research for Rural Development* 18 (2) 2006. <http://www.lrrd.org/lrrd18/2/corr18031.htm>.
16. Cuervo W. Orrego C. Correa H. 2011. Efecto de la adición de sales de magnesio sobre la actividad ruminal in vitro de γ glutamil transferasa. *Rev Colomb Cienc Pecu* 2011; 24:3.
17. Cuervo W. Orrego C. Correa H. 2011b. Determinación de la actividad in situ de gama glutamil transferasa (GGT) bajo el efecto de infusión ruminal de magnesio. *Rev Colomb Cienc Pecu* 2011; 24:3.
18. Damir H. Phillippo M. Thorp B. Milne J. Dick L. Inevison I. 1994. Effects of dietary acidity on calcium balance and mobilisation, bone morphology and 1,25 dihydroxyvitamin D in prepartal dairy cows. *Research in Veterinary Science*, Volume 56, Issue 3, May 1994, Pages 310–318
19. Dehority B. Orpin C. 1997. Development of and natural fluctuations in, rumen microbial populations. *The Rumen Microbial Ecosystem*. 1997, pp 196-245
20. Doepel L. Lapierre H. Kennelly J. 2002. Peripartum Performance and Metabolism of Dairy Cows in Response to Prepartum Energy and Protein Intake. *J. Dairy Sci.* 85:2315–2334
21. Duarte v. Magaña c. Rodríguez g. 1996. Respuesta de Toretas en Engorda a la Adición de Tres Niveles de Pollinaza a Dietas Integrales. *Livestock Research for Rural Development*. Volume 8, Number 2, July 1996
22. Erdman, R. A., R. L. Botts, R. W. Hemken, and L. S. Bull. 1980. Effect of dietary sodium bicarbonate and magnesium oxide on production and physiology in early lactation. *J. Dairy Sci.* 63:923– 930.
23. Faixová Z, Faix F. 2002. Influence of metal ions on ruminal enzyme activities *Acta vet. Brno* 2002, 71: 451–455.
24. Faixová, Z. Faix, Š. 2005. Manipulation of rumen nitrogen metabolism. (A review). *Folia Veterinaria*, 49, 4: 215—219, 2005.

25. Faixová zita, faix, maková, váczi, prosbová. 2006. Effect of divalent ions on ruminal enzyme activities in sheep. *Acta veterinaria (beograd)*, V56(1), 17-23,
26. Faverdin, P., B. Richou, and J.-L. Peyraud. 1992. Effects of digestive infusions of volatile fatty acids or glucose on food intake in lactating or dry cows. *Ann. Zootech. (Paris)* 41:93.
27. Fernando, H. T. Purvis F. Z. Najar L. O. Sukharnikov C. R. Krehbiel. T. G. Nagaraja, B. A. Roe and U. DeSilva. 2010. Rumen Microbial Population Dynamics during Adaptation to a High-Grain Diet. *Applied And Environmental Microbiology*, Nov. 2010, p. 7482–7490 Vol. 76, No. 22.
28. Frahm, K. Graf F. Krausslich H. and Osterkorn K. 1978. Enzymaktivitäten in Rinderorganen. I Organanalysen bei Holstein Freisian K~hen. *Zbl. Vet. Med.* 25A: 297-306.
29. Garcia A. 2009. Alimentación preventiva de la vaca en transición. South Dakota State University / College of Agriculture & Biological Sciences / USDA. Contenido en línea: http://pubstorage.sdstate.edu/AgBio_Publications/articles/ExEx4041S.pdf
30. Garcia-Gomez, F, Williams, Pa, Aumaitre, A, Lee, Bd, Ha, Jk 2000: Magnesium metabolism in ruminant animals and its relationship to other inorganic elements. *Proceedings of the 2000 International Symposium: Recent Advances in Animal Nutrition*, Seoul, Korea, 20-22 April 2000. *Asian-Austr J Anim Sci* 13: 158-170
31. García-sanmartín J. García-perez A. Barandika J. Adúriz G. Ziluaga I. Juste R. Berriatua, E. 2001. Actividad sérica de gamma-glutamyltransferasa (GGT) y aspartato aminotransferasa (AST-GOT) en ovejas del país vasco. Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario (NEIKER), 48160 - Derio. Bizkaia.
32. Gentry, R.P., Miller, W.J. and Pugh, D.G. (1978) Effects of feeding high magnesium to young dairy calves. *Journal of Dairy Science* 61, 1750.
33. GeoHack 2013. Coordenadas Aratoca. Contenido en Línea: http://toolserver.org/~geohack/geohack.php?pagename=Aratoca&language=es¶ms=06_41__N_73_01__W_type:city

34. Giduck S. Fontenot J and Rahnema S. 1988. Effect of Ruminant Infusion of Glucose, Volatile Fatty Acids and Hydrochloric Acid on Mineral Metabolism in Sheep. *J Anim Sci* 1988. 66:532-542
35. Giri S. Jaggi S. Pathak N. 2005. Feeding of grainless diets containing different nitrogen sources to crossbred growing bulls: effects on rumen fermentation pattern, microbial enzyme activity and ciliate protozoa population. *Animal Feed Science and Technology*. 118 (2005) 187–200.
36. Glassey C. Davey A. Holmes C. 1980. The effect of herbage allowance on the dry matter intake and milk production of dairy cows. *Proc. of the New Zealand Society of Animal Production*. 40:59
37. González M. Van Heurck L. Romero F. Pezo D. Argel P. 1996. Producción de leche en pasturas de estrella Africana (*Cynodon nlemfuensis*) solo y asociado con *Arachis pintoi* o *Desmodium ovalifolium*. *Pasturas Tropicales*. Vol 18 (1).
38. Greenhalgh J. Reid G. Aitken J. Florence E. 1966. The effects of grazing intensity on herbage consumption and animal production. I. Short-term effects in strip-grazed dairy cows. *J. Agric. Sci. Camb.* 67:13
39. Guhl A. 2009. Café, bosques y certificación agrícola en Aratoca, Santander. *rev. estud. soc.* No.32 Bogotá Jan./Apr. 2009
40. Gustafsson A. Palmquist D. 1993. Diurnal Variation of Rumen Ammonia, Serum Urea, and Milk Urea in Dairy Cows at High and Low Yields. *Journal of Dairy Science*, Volume 76, Issue 2: 475–484
41. Gustafsson AH, Palmquist DL. 1993. Diurnal variation of rumen ammonia, serum urea, and milk urea in dairy cows at high and low yields. *J Dairy Sci* 1993; 76:475-484.
42. Hammond AC. 1994. Use of Blood urea nitrogen concentration to guide protein supplementation in cattle. *Am Regi Prof Ani Sci* 1994; 10:9-18.
43. Hanigan MH, Frierson HF. 1996. Immunohistochemical detection of G-glutamyl transpeptidase in normal human tissue. *J Histochem Cytochem* 1996; 44: 1101–1108.
44. Henry, P.R. and Benz, S.A. 1995. Magnesium bioavailability. In: Ammerman, C.B., Baker, D.H. and Lewis, A.J. (eds) *Bioavailability of Nutrients for Animals*. Academic Press, New York, pp. 239–256.

45. Hernandez D. Carballo M. Reyes F. 2000. Reflexiones sobre el uso de los pastos en la producción sostenible de leche y carne de res en el trópico. *Revista Pastos y Forrajes*. Vol 1. No 1. 2000.
46. Hess H. Florez H. Lascano C. Baquero L. Becerra A. Ramos J. 1999. Fuentes de variación en la composición de leche y niveles de urea en sangre y leche de vacas en sistemas de doble propósito en el trópico bajo de Colombia. *Pasturas Tropicales* Vol. 21. No 1. 33-42.
47. Hobson PN and Stewart C S. 1997. *The Rumen Microbial Ecosystem*, Blackie Academic & Professional, London.
48. Hof G, Vervoorn, MD, Lenaers PJ, Tamminga S. 1997. Milk urea nitrogen as a tool to monitor protein nutrition of dairy cows. *J Dairy Sci* 1997; 80:3333-3340.
49. Hofmeister F. 1880. *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.* 24, (1888) 247-260.
50. Hojman D, Gips M, Ezra E. 2005. Association between live body weight and milk urea concentration in Holstein cows. *J Dairy Sci* 2005; 88:580-584.
51. Hojman D., Kroll O., Adin G., Gips M., Hanochi B. and Ezra E. 2004. Relationships between milk urea and production, nutrition, and fertility traits in Israeli dairy herds. *J. Dairy Sci.* 87:1001–1011.
52. Holdridge L. 1996. *Ecología basada en zonas de vida*. San José de Costa Rica: Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura.
53. Hoshino S. Saramaru K. Morimoto K. 1966. Ammonia Anabolism in Ruminants. *J Dairy Science*. Vol. 49, No 12
54. <http://www.bdigital.unal.edu.co/6409/1/780234.2012.pdf>
55. <http://www.exopol.com/seoc/docs/0g1m78f4.pdf>
56. Hungate, R. E. 1968. Ruminal fermentation, p. 2725–2745. In C. F. Code (ed.), *Handbook of physiological*. American Physiological Society, Washington, DC.
57. Huntington G. 1980. Correlation of blood urea N with various N and energy parameters in feedlot steers. *J Anim Sci* 1980; 51(Suppl.1):371 (Abstract).

58. Instituto Geográfico Agustín Codazzi. 1996. Aratoca. En Diccionario geográfico de Colombia (Tomo 1), ed. Ángela Andrade, 128-129. Bogotá: IGAC
59. Jittakhot S. Schonewille J. Wouterse H. Yuangklang C, and Beynen C. 2004. Apparent Magnesium Absorption in Dry Cows Fed at 3 Levels of Potassium and 2BY. *J. Nutr.* (1967), 21, 819-819
60. Johnson, C.L., Helliwells, S.H. and Aubrey Jones, D.A. 1988. Magnesium metabolism in the rumens of lactating dairy cows fed on spring grass. *Quarterly Journal of Experimental Physiology* 73, 23–31.
61. Joyner A. Baldwin R. 1966. Enzymatic Studies of Pure Cultures of Rumen Microorganisms. *Journal Of Bacteriology*, Nov., 1966. Vol. 92, No. 5
62. Kanjanapruthipong J, Homwong N, Buatong N. 2010. Effects of prepartum roughage neutral detergent fiber levels on periparturient dry matter intake, metabolism, and lactation in heat-stressed dairy cows. *J Dairy Sci.* 2010 Jun;93(6):2589-97.
63. Krysl LJ, Judkins MB, Bohman VR. 1991. Influence of ruminal or duodenal soybean oil infusion on intake, ruminal fermentation, site and extent of digestion, and microbial protein synthesis in beef heifers consuming grass hay. *J Anim Sci.* 1991 Jun;69(6):2585-90.
64. Le du, Combellas Y. Hodgson J. Baker R. 1979. Herbage intake and milk production by grazing dairy cows. 2. The effects of level of winter feeding and daily herbage allowance. *Grass and Forage Science.* 34:249.
65. Leibholz, J. 1969. Poultry manure and meat meal as a source of dietary nitrogen for sheep. *Australian J. Exptl. Agr. Anim. Husbandry* 9: 589.
66. Lema R. Martínez S. Pedraza R. García E. 2012. Optimización de la transportación y distribución de gallinaza para la alimentación del ganado lechero en la época de seca. *Rev. prod. anim.*, 24 (1): 2012
67. Lewis D. 1957. Blood urea concentration in relation to protein utilization in the ruminant. *J Agri Sci* 1957; 48:438.

68. Malherbe, W. Kellerman D. Krick T. and Haupt W. 1977. Gamma-glutamyl-transpeptidase activity in sheep's serum: normal values and an evaluation of its potential for detecting liver involvement in experimental lupinosis. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, 44: 29-38.
69. Marqués S. 1988. Estudios sobre la vía de asimilación de amonio en cianobacterias. Glutamato sintasa y glutamina sintetasa de *Synechococcus* 6301. Tesis doctoral. Universidad de Sevilla. Contenido en línea:
70. Martens S. 1983. Saturation kinetics of magnesium efflux across the rumen wall in heifers. *Brit. J. Nutr.* 49:153
71. Martens, H. and Blume, I. 1986. Effect of intraruminal sodium and potassium concentrations and of the transmural potential difference on magnesium absorption from the temporarily isolated rumen of sheep. *Quarterly Journal of Experimental Physiology* 71, 409–415
72. Martín E, Pérez E, Cañón S, Rodríguez J, Rodríguez F. 2005. Sonda oro-ruminal experimental como alternativa para la obtención de microorganismos anaeróbicos del rumen. *Revista Corpoica* 2005; 6(1): 39 - 42.
73. McGovern K. Blanchard T. Gutierrez J. Czinn S. Krakowka S. Youngman P. 2001. γ -Glutamyltransferase Is a *Helicobacter pylori* Virulence Factor but Is Not Essential for Colonization. *Infect. Immun.* 2001, 69(6):4168
74. McLaren G. 1964. Nitrogen metabolism on rumen. In: Symposium on microbial digestion in ruminants. *J Anim Sci* 1964. 23:577-590.
75. Meeks J. Wolk C. Thomas W. Lockau P. Shaffer S. Austin W. Chien S. Galonskt A. 1977. The Pathway of assimilation the nitrogen metabolism after fixation of $^{13}\text{NH}_4$ by the cyanobacterium, *Anabena cylindrica*. *J. Biol. Chem.* 252: 7894 – 7900.
76. Nakayama R. Kumagai H. Tochikura T. 1984. γ -Glutamyltranspeptidase from *Proteus mirabilis*: Localization and Activation by Phospholipids. *Journal Of Bacteriology*, Dec. 1984, p. 1031-1036 Vol. 160, No. 3
77. Nelson D, Cox M. 2001. *Lehninger Principles of Biochemistry*. cap 18;657-659.

78. NRC. National Research Council - Nutrient Requirements of Dairy Cattle. 2001. Seventh Revised Edition.
79. Oba M., Baldwin VI R. L., Owens S. L. and Bequette B. J. 2004. Metabolic fates of ammonia-n in ruminal epithelial and duodenal mucosal cells isolated from growing sheep. *J. Dairy Sci.* 88:3963–3970.
80. Pabon M 2004. Notas de clase bioquímica ruminal. Facultad de ciencias Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá
81. Pan J. Suzuki T. Koike S. Ueda K. Kobayashi Y. 2003. Effects of urea infused into the rumen on liquid- and particle-associated fibrolytic enzyme activities in steers fed low quality grass hay. *Animal Feed Science and Technology.* 104 (2003) 13–27
82. Pardo O. Carulla J. Hess H. 2008. Efecto de la relación proteína y energía sobre los niveles de amonio ruminal y nitrógeno ureico en sangre y leche, de vacas doble propósito del piedemonte llanero, Colombia. *Rev Colomb Cienc Pecu* 2008; 21:387-397
83. Paster B. Rusell J. Yang J. Chow M. Woese C. Tanner R. 1993. Phylogeny of the Ammonia-Producing Ruminal Bacteria *Peptostreptococcus anaerobius*, *Clostridium sticklandii*, and *Clostridium aminophilum* sp. nov. *International Journal Of Systematbiacc Teriology*, Jan. 1993, p. 107-110
84. Preston R. Breuer H. Pfander W. 1961 Blood urea and rumen ammonia in sheep as affected by level and source of carbohydrate and protein. *J. Animal Sci.*, 20: 947
85. Preston R. Schnakenberg D. Pfander W. 1964. Protein Utilization in Ruminants I. Blood Urea Nitrogen As Affected By Protein Intake. *J. Nutrition*, 86: '65
86. Rauch R. Robinson P. Erasmus L. 2012. Effects of sodium bicarbonate and calcium magnesium carbonate supplementation on performance of high producing dairy cows. *Animal Feed Science and Technology* 177 (2012) 180– 193

87. Reynolds CK (1995) Quantitative aspects of liver metabolism in ruminants. In Ruminant Physiology: Digestion, Metabolism, Growth and Reproduction, pp. 351±371 [WV Engelhardt, S Leonhard-Marek, G Breves and D Giesecke, editors]. Stuttgart, Germany: Ferdinand Enke Verlag.
88. Rico A. Braun J. Benard P. 1977. Blood and Tissue Distribution of Gamma Glutamyl Transferase in the Cow. 1977 J Dairy Sci 60:1283-1287.
89. Rodwell V 2003. Biosynthesis of the Nutritionally Nonessential Amino Acids In Harper´s Biochemistry 26th Edition. Cap 28.
90. Rodwell V. Kenelly P. 2003. Enzymes: Mechanism of Action IN Harper´s Illustrated Biochemistry. Cap 7: p57.
91. Ropstad E, Vik-Mo L, Refsdal AO 1989. Levels of milk urea, plasma constituents and rumen liquid ammonia in relation to the feeding of dairy cows during early lactation. Acta Vet Scand. 1989;30(2):199-208.
92. Roseler D. Ferguson J. Sniffen C. Herrema J. 1993. Dietary Protein Degradability Effects on Plasma and Milk Urea Nitrogen and Milk Nonprotein Nitrogen In Holstein Cows. Journal of Dairy Science, Volume 76, Issue 2, February 1993, Pages 525–534
93. Roth P and Werner E. 1979. Intestinal absorption of magnesium in man Int. J. Appl. Rad. Isot. 30:523
94. Ruiz, R. Cairo J. Martinez R. Herrera R. 1981. Producción de leche con vacas en pasto bermuda cruzada-1 (*Cynodon dactylon* Pers.). II. Estructura del césped y potencial productivo. Rev. cubana Cienc. agríc. 15:129.
95. Sanchez J. Soto H. 1997. Estimación de la calidad nutricional de los forrajes del Canton de San Carlos. II. Componentes de la pared celular. Nutricion Animal tropical 4(1)
96. Sanchez J. Soto H. 1999. Calidad Nutricional de los forrajes de una zona con niveles medios de producción de leche, en el trópico húmedo del norte de Costa Rica. Agronomía Costanicense 23(2): 165-171. 1999
97. Saro C. Ranilla J. Tejido M and Carro M. 2012. Influence Of Forage Type On Ruminant Microbes And Bacterial Diversity In Sheep. Animal Feed Science and Technology

98. SAS 2002. The SAS Institute Inc. NC, USA. Copyright (c) 2002. Licensed to SUNY AT STONY BROOK, Site 0013402001.
99. Satter, L.D., Slyter, L.L., 1974. Effect of ammonia concentration on rumen microbial protein production in vitro. *Br. J. Nutr.* 32, 199–208.
100. Scandolo D. Noro M. Böhmwald H, Contreras P, Wittwer F. 2007. Variación diaria del pH y de las concentraciones de magnesio y potasio del fluido ruminal en vacas lecheras a pastoreo. *Arch. Med. Vet.* 39, N° 2, 2007.
101. Schepers AJ, Meijer RG. 1988. Evaluation of the utilization of dietary nitrogen by dairy cows based on urea concentration in milk. *J Dairy Sci* 1988; 81:579-584
102. Schonewille J, H. Everts, Jittakhot S, y Beynen A 2007. Quantitative Prediction of Magnesium Absorption in Dairy Cows. *J. Dairy Sci.* 91:271–278
103. Schonewille, J. T. 1999. Magnesium absorption in ruminants. Ph.D. Thesis, Utrecht University, Utrecht, The Netherlands.
104. Skoog D. West D. 2002. Introducción a la química analítica. Editorial Reverte. P. 27-29
105. Smith K. Butler W. Overton T. 2009. Effects of prepartum 2,4-thiazolidinedione on metabolism and performance in transition dairy cows. *Journal of Dairy Science*, Volume 92, Issue 8, August 2009, Pages 3623–3633
106. Socha M. Putnam D. Garthwaite D. Whitehouse N. Kierstead A. Schwab C. Ducharme G. Robert J. 2005. Improving Intestinal Amino Acid Supply of Pre- and Postpartum Dairy Cows with Rumen-Protected Methionine and Lysine. *J. Dairy Sci.* 88:1113–1126.
107. Solla 2012. Contenido en línea: <http://www.solla.com/es/fase/ganaderia/lecheria-especializada/produccion>
108. Soto C, Valencia A, Galvis R D y Correa H J 2005. Efecto de la edad de corte y del nivel de fertilización nitrogenada sobre el valor energético y proteico del pasto kikuyo (*Pennisetum clandestinum*). *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. Volume 18 (1): 17 - 26.

- Retrieved December 10, 2005, from http://rccp.udea.edu.co/v_anteriores/18-3/pdf/18-1-3.pdf.
109. Spears, J, Hatfield, E 1978. Nickel for ruminants. Influence of dietary nickel on ruminal urease activity. *J Anim Sci* 47: 1345-1350
 110. Suttle B. Field. A. (1967) Studies on magnesium in ruminant nutrition. 8." Effect of increased intakes of potassium and water on the metabolism of magnesium, phosphorus, sodium, potassium and calcium in sheep. *B Y. J. Nutr.* (1967), 21, 819
 111. Suttle N. 1999. *The Mineral Nutrition of the livestock* 3rd Edition. Cap 1:14-17
 112. Suttle, N.F. and Brebner, J. (1995) A putative role for larval nematode infection in diarrhoea of lambs which do not respond to anthelmintic drenches. *Veterinary Record* 137, 311–316.
 113. Taniguchi N, Ikeda Y.1998. Gamma-Glutamyl transpeptidase: catalytic mechanism and gene expression. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 1998; 72: 239–78.
 114. Tate S. Meister A. 1974. Interaction of gamma-glutamyl transpeptidase with amino acids, dipeptides, and derivatives and analogs of glutathione. *J Biol Chem.* 1974; 249:7593–7602. [PubMed: 4154944]
 115. Teeter, R.G., Owens, F.N. and Mader, T.L. 1984. Ytterbium chloride as a marker for particulate matter in the rumen. *Journal of Animal Science* 58, 465–473.
 116. Thomas J. 1983. Magnesium in animal nutrition. In: *Minerals the often neglected nutrients*. Proc. Natl. Feed ingredients Assoc. Nutrition Institute, Chicago.
 117. Thomas J., Emery R., Breaux J, Liesman J. (1984) Response of milking cows fed a high concentrate, low roughage diet plus sodium bicarbonate, magnesium oxide, or magnesium hydroxide. *J Dairy Sci.* 1984 Nov; 67(11):2532-45.
 118. Thompson G. Meister A. 1974. Hydrolysis and transfer reactions catalyzed by gamma-glutamyl transpeptidase; evidence for separate substrate sites and for high affinity of L-cystine. *Biochem Biophys Res Commun.* 1976; 71:32–36. [PubMed: 9080]

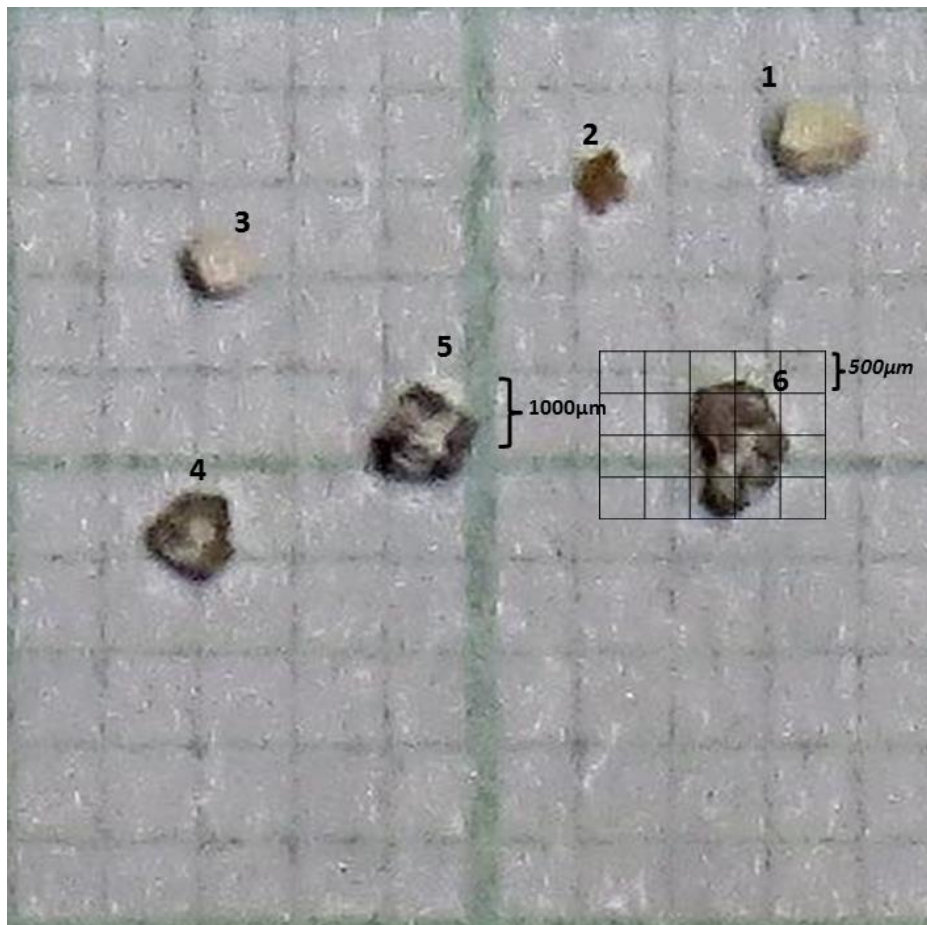
119. Tomas F and Potter B. 1976. The site of magnesium absorption from the ruminant stomach. *Br. Y. Nutr.* (1976), 36
120. Tsubota H. Hoshino S. 1969. Transaminase Activity in Sheep Rumen Content. *Journal of dairy science* col. 52, no. 12.
121. Underwood E. Suttle N. 1999. The mineral nutrition of livestock 3rd edition. CABI International. Cap 6. P 175.
122. Unglaub W. Afschar A. and Marx D. 1973. Die Aktivität der γ -GT (gamma-Glutamyltranspeptidase) im Serum des Rindes. *Dtsch. Tierärztl. Wschr.* 80:131.
123. Vallimont G. Varga G. Arielli A. Cassidy T. Cummins K. 2001. Effects of Prepartum Somatotropin and Monensin on Metabolism and Production of Periparturient Holstein Dairy Cows. *Journal of Dairy Science* Volume 84, Issue 12, Pages 2607-2621, December 2001.
124. Van der Walt JG (1993) Nitrogen metabolism of the ruminant liver. *Australian Journal of Agricultural Science* 44, 381- 403
125. Van Lier E. Regueiro M. 2008. Digestión en retículo – rumen. Departamento de producción animal y de pasturas. Curso de Anatomía y Fisiología animal.
126. Van Mosel, M., T. van't Klooster, and A. Malestein. 1990. Effects of an inadequate dietary intake of magnesium on osteogenesis in dairy cows during the dry period. *Research in Veterinary Science* 48:280– 287.
127. Van Soest P J 1994 Nutritional ecology of the ruminant; Cornell University Press, Cornell University, Ithaca, New York. 476 p
128. Veth, M. J., De Kolver, E. S., De Veth, M. J., Cottle, D., 1999: Pasture digestion in response to change in ruminal pH. 59th conference, Holy Cross College, Mosgiel, 28 June – 1 July, 1999. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production*, 59, 66—69.
129. Weimer P. Waghorn G. Odt L. Mertens D. 1998. Effect of Diet on Populations of Three Species of Ruminal Cellulolytic Bacteria in Lactating Dairy Cows. 1999 *J Dairy Sci* 82:122–134
130. Whitfield J. 2001. Gamma Glutamyl Transferase. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 38(4):263–355 (2001)
131. Willey, J. D. 2004. The effect of ionic strength on the solubility of an electrolyte', *Journal of Chemical Education* 81, 1644–1646.

132. Wilson G. 1980. Effects of magnesium supplements on the digestion of forages and milk production of cows with hypomagnesaemia. *Animal Prod.* 31:153 - British Society of Animal Science 1980 DOI: <http://dx.doi.org/10.1017/S0003356100024387>
133. Wilye M. Fontenont J. Greene W. 1985. Absorption of magnesium and other macrominerals in sheep infused with potassium in different parts of the digestive tract. *Journal of animal science*, Vol. 61, No. 5, 1985
134. Wolk C. Thomas W. Lockau P. Shaffer S. Austin W. Chien S. Galonskt A. 1976. Phatway for the nitrogen metabolism after fixation of ¹³N labeled nitrogen gas by the cyanobacterium, *Anabena cylindirca*. *J. Biol. Chem.* 251: 5027 – 5034.
135. Xin, Z., Tucker, W.B. and Hemken, R.W. (1989) Effect of reactivity rate and particle size of magnesium oxide on magnesium availability, acid–base balance, mineral metabolism and milking performance of dairy cows. *Dairy Science* 72, 462–470.

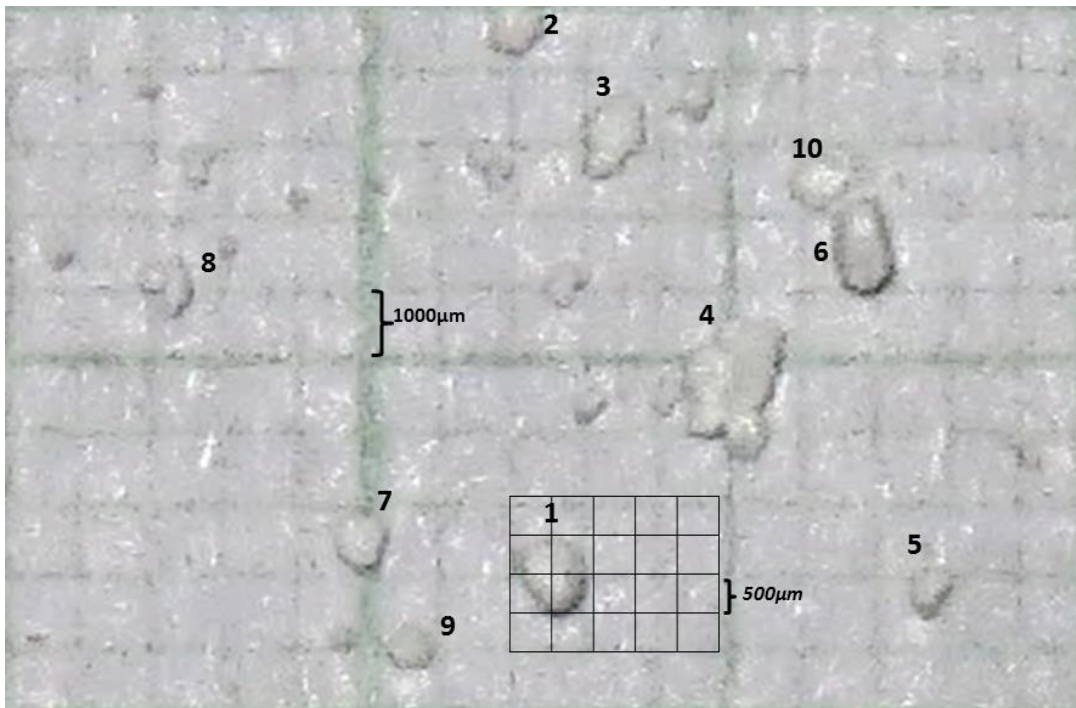
ANEXOS

Muestras de partícula para la determinación del tamaño de partícula de las fuentes minerales utilizadas en el experimento, medidas sobre papel milimetrado con divisiones de 1mm ($1000\mu\text{m}$)

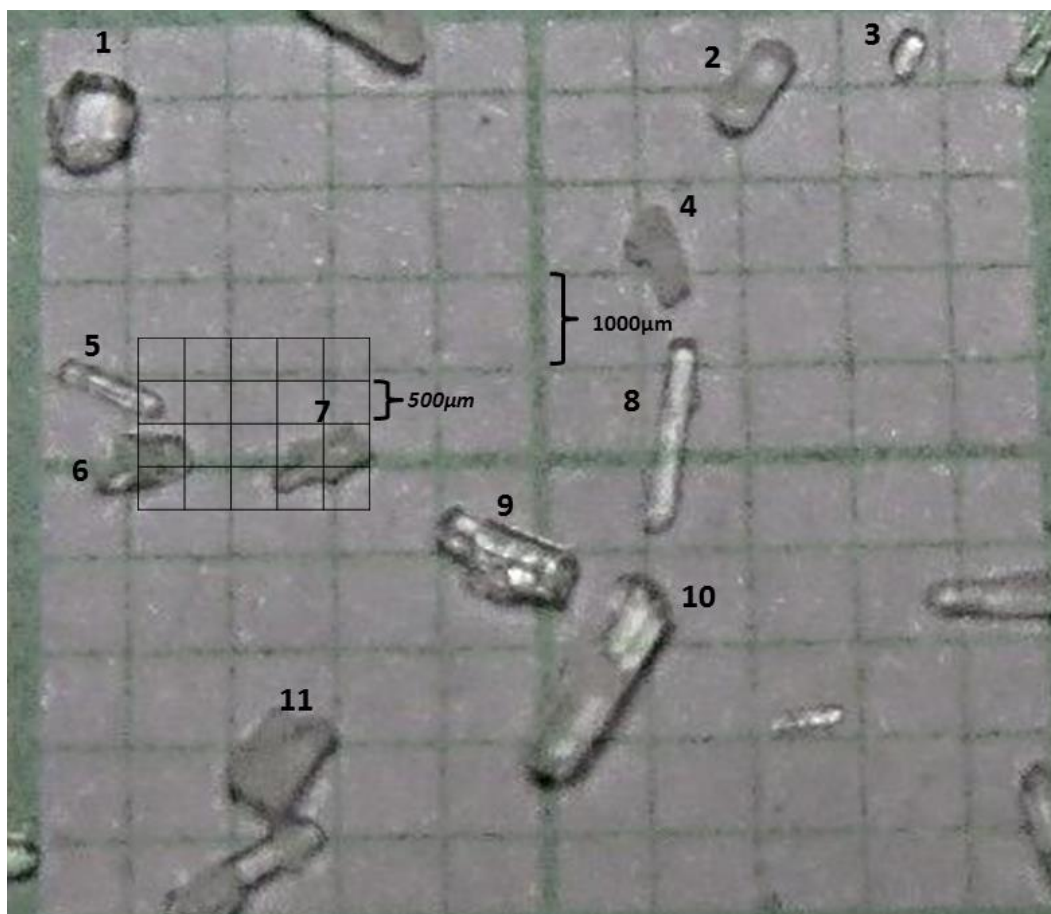
2.6.1 Tamaño de Partícula MgO



2.6.2 Tamaño de partícula $MgCO_3$



2.6.3 Tamaño de partícula $MgSO_4$



2.6.4 Tamaño de partícula $MgCl_2$

