



## Efectos sobre el pH del rumen y la ingesta de alimento de un desafío de concentrado dietético en vacas alimentadas con raciones que contienen moduladores del pH con diferente capacidad de neutralización

Alex Bach,<sup>1,2\*</sup> † Méloody Baudon,<sup>3</sup> Guillermo Elcoso,<sup>4</sup> Javier Viejo,<sup>5</sup> and Aurore Courillon<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Marlex Recerca i Educació, Barcelona, Spain 08173

<sup>2</sup>Institució de Recerca i Estudis Avançats (ICREA), Barcelona, Spain 08010

<sup>3</sup>Timab Magnesium, Dinard, France 35803

<sup>4</sup>Blanca from the Pyrenees, Hostalets de Tost, Spain 25795

<sup>5</sup>Tecnivet, Madrid, Spain 28939

### RESUMEN

Cuarenta y cinco vacas Holstein en lactación ( $41 \pm 8,8$  kg/día de producción de leche,  $96 \pm 35,6$  días en leche y  $607 \pm 80,4$  kg de peso corporal) se inscribieron en este estudio para evaluar los efectos de las dietas suplementadas con bicarbonato sódico o un producto a base de magnesio y sus correspondientes diferencias en la diferencia catión-anión de la dieta (DCAD) sobre el pH ruminal, la población microbiana del rumen y el rendimiento en leche del ganado lechero expuesto a una disminución inducida del pH ruminal a través de un desafío dietético. Las vacas fueron asignadas aleatoriamente a 3 raciones mixtas totales (TMR) que diferían en el tipo de suplemento para modular el pH del rumen: (1) control, sin suplementación; (2) SB, suplementada con 0,82% de bicarbonato sódico con una capacidad neutralizante (NC) de 12 mEq/g; y (3) MG, suplementada con 0,25% de óxido de magnesio (pHix- Up, Timab Magnesium) con una NC de 39 mEq/g. Así pues, las raciones SB y MG tenían, en teoría, la misma NC. Las 3 TMR diferían para el control, SB y MG en su DCAD-S (calculada teniendo en cuenta Na, K, Cl y S), que era, de media, de 13,2, 21,2 y 13,7 mEq/100 g, respectivamente, o DCAD-Mg (calculada teniendo en cuenta Mg, Ca y P), que era de 31,4, 41,2 y 35,2 mEq/100 g, respectivamente. El estudio duró 63 días, de los cuales los primeros 7 sirvieron como línea de base, seguidos de una disminución progresiva quincenal de la relación forraje/concentrado (FCR) de la dieta, comenzando en 48:52, luego 44:56, después 40:60, y terminando en 36:64. La ingesta individual de materia seca (DMI) se calculó sobre la base de la relación forraje/concentrado. Se registró diariamente la ingesta individual de materia seca (IMD). Siete vacas por tratamiento fueron equipadas con bolos ruminales electrónicos para controlar el pH del rumen. Las vacas control y SB consumieron menos materia seca (MS;  $23,5 \pm 0,31$  kg/d) que las vacas MG ( $25,1 \pm 0,31$  kg/d) cuando se alimentaron con dietas FCR de 44:56 y 40:60.

La leche corregida energéticamente (ECM) disminuyó de  $40,8 \pm 1,21$  a  $39,5 \pm 1,21$  kg/día a medida que disminuía el FCR de la dieta, independientemente de los tratamientos dietéticos. El pH ruminal disminuyó y la proporción del día con pH ruminal  $<5,8$  aumentó a medida que disminuyó el FCR dietético, y a un FCR dietético bajo (es decir, 36:64) el pH ruminal fue mayor en las vacas MG que en las vacas control y SB. La reducción de la DCAD-S de 28 a 18 mEq/100 g o de la DCAD-Mg de 45 a 39 mEq/kg no tuvo efectos sobre la IMD o la producción de leche. Las vacas suplementadas con  $\sim 62$  g/d de óxido de magnesio (pHix-Up) mantuvieron un mayor pH ruminal y consumieron más MS que las vacas suplementadas con  $\sim 200$  g/d de bicarbonato sódico cuando se alimentaron con una dieta con bajo FCR.

**Palabras clave:** diferencia catión-anión en la dieta, consumo, acidosis ruminal.

### INTRODUCCIÓN

La mejora genética progresiva del ganado lechero ha conducido a un aumento continuo de la capacidad de producción de leche. Este elevado potencial de producción de leche sólo puede alcanzarse si la dieta que pueden consumir las vacas aporta suficiente energía y nutrientes. La elevada demanda de energía suele satisfacerse mediante raciones con cantidades crecientes de NFC y, en cierta medida, añadiendo grasa a la dieta. Sin embargo, el aumento de la cantidad de NFC suele ir acompañado de una reducción de la provisión de forraje, y tanto las altas cantidades de NFC, que pueden fermentar vigorosamente en el rumen, como el bajo suministro de forraje pueden conducir a una acumulación de productos finales de fermentación, que a su vez pueden disminuir el pH del rumen (Blanch et al., 2010). La reducción del pH ruminal puede alterar la microbiota ruminal (Ishaq et al., 2017), la fermentación ruminal (Stefanska et al., 2018) y el rendimiento general de los animales (Danscher et al., 2015).

Se pueden utilizar varias estrategias para controlar el pH del rumen, como suplementar las raciones con agentes neutralizantes (Bach et al., 2018; Humer et al., 2018), levadura viva (Throne et al., 2009; Bach et al., 2019) o cultivos de levaduras (Dias et al., 2018), entre otros.

Received September 5, 2022.

Accepted January 4, 2023.

\*Corresponding author: [alex.bach@icrea.cat](mailto:alex.bach@icrea.cat)

†Currently on leave of absence from ICREA.

En cuanto al uso de agentes neutralizantes, varios estudios informan de aumentos en la IMD (Erdman et al., 1982; Rogers et al., 1985; Staples et al., 1988) y en el rendimiento del ordeño (Kilmer et al., 1981; Thomas et al., 1984; Rogers et al., 1985) al suplementar las raciones con bicarbonato sódico. Sin embargo, se dispone de menos datos sobre los efectos del óxido de magnesio en el rendimiento de las vacas lecheras (Beede, 2017; Bach et al., 2018; Tebbe et al., 2018).

La diferencia catión-anión en la dieta (DCAD) se ve muy afectada por la suplementación con bicarbonato sódico, y varios autores han informado de mejoras en la producción de leche y la IMD cuando aumenta la DCAD (Sánchez y Beede, 1996; Hu y Murphy, 2004; Iwaniuk y Erdman, 2015). Sin embargo, cuando se depende de fuentes de óxido de magnesio en lugar de bicarbonato de sodio para controlar el pH ruminal, la DCAD disminuye y existe la preocupación de que esto pueda afectar a la DMI y a la producción de leche. La diferencia catión-anión en la dieta se calcula normalmente considerando el contenido dietético de K, Na, Cl y S (Jackson et al., 2001), pero alternativamente, la DCAD también puede calcularse considerando el contenido dietético de K, Na, Ca, Mg, P, Cl y S (Goff et al., 1997). En este caso, la hipótesis era que la reintroducción de bicarbonato sódico y el suministro de óxido de magnesio no tendrían efectos perjudiciales sobre la IMD o la producción de leche. Además, la DCAD entre las dietas que contienen bicarbonato sódico u óxido de magnesio no diferiría mucho cuando se tuviese en cuenta su contenido en Mg. Así pues, el objetivo de este estudio fue evaluar los efectos de las dietas suplementadas con bicarbonato sódico o con un producto a base de magnesio y sus correspondientes diferencias en la DCAD sobre el pH ruminal, la población microbiana ruminal y el rendimiento en leche del ganado lechero sometido a una disminución inducida del pH ruminal mediante un desafío dietético.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Todos los procedimientos con animales se llevaron a cabo bajo la supervisión y aprobación del Comité de Cuidado Animal del Instituto de Investigación y Tecnología Agroalimentarias (Barcelona, España; número de expediente: 11456).

Cuarenta y cinco vacas lactantes (múltiparas) se dividieron aleatoriamente en 3 tratamientos ( $n = 15$ ). La aleatorización se realizó mediante un script generador de aleatoriedad en Python escrito por el autor AB (2020). El tamaño de la muestra se definió para la producción de grasa láctea como variable de resultado principal (ya que se esperaba que recogiera los efectos potenciales de la IMD, la producción de leche y los cambios en el rumen) basándose en un análisis de potencia para medidas repetidas realizado con GLIMMPSE ([www.glimmpse.samplesizeshop.org](http://www.glimmpse.samplesizeshop.org)) y una prueba de trazas de Hotelling-Lawley (Akbari et al., 2013) con una potencia = 0,80,  $\alpha = 0,05$ , y una desviación típica prevista de 0,3 unidades.

Las vacas se ordeñaban dos veces al día y se les proporcionaba alimento dos veces al día, con un objetivo de rechazo diario del 3%. El personal de la granja no conocía los tratamientos. Las vacas se alojaron en un único corral equipado con establos libres con camas cada 2 días con paja picada y equipadas con 60 (20 por tipo de suplemento dietético) comederos electrónicos (MooFeeder, MooSystems) que controlaban el acceso de las vacas del mismo corral a los comederos específicos que contenían los diferentes tratamientos dietéticos. Los comederos electrónicos, además de controlar el acceso al alimento, registraban la hora del día y la cantidad de alimento consumido en cada visita a lo largo del estudio.

El estudio siguió un diseño aleatorio completo con 3 tratamientos. Las vacas fueron asignadas aleatoriamente a 3 TMR que diferían en el tipo de suplemento para modular el pH ruminal: (1) una TMR sin suplementación (control), (2) una TMR suplementada con 0,82% de bicarbonato sódico (SB), y (3) una TMR suplementada con 0,25% de una mezcla de óxido de magnesio (MG; pHix-Up, Timab Magnesium). Se determinó que el bicarbonato sódico tenía una capacidad neutralizante (NC) de 12 mEq/g, y que la mezcla de óxido de magnesio tenía una NC de 39 mEq/g; por tanto, tanto el SB como el MG se formularon para tener una NC equivalente. El NC se evaluó siguiendo a Bach et al. (2018). Brevemente, se determinaron los miliequivalentes de protones (de ácido clorhídrico) necesarios para reducir el pH de una solución que contenía 2,5 g de bicarbonato de magnesio o de sodio en un volumen de 50 mL a un pH de 3 partiendo de un pH de 5,5 o 6,5.

Durante el estudio (realizado entre junio y septiembre de 2021), se aumentó progresivamente la cantidad de cebada incluida en la ración. Tras un periodo basal de 7 días, en los siguientes periodos de 14 días se sustituyó 1 kg de forraje por 1 kg de cebada. Las diferentes TMR consumidas por las vacas se representan en la Tabla 1. La ración de control para el periodo 1 fue la misma que se suministró a todas las vacas de todos los tratamientos durante el periodo basal o previo a la prueba de 7 días. Todos los granos se incluyeron en la TMR molidos entre 2 y 3 mm, y los forrajes se picaron a una longitud de corte teórica de 30 mm. Se tomaron muestras de TMR a intervalos semanales. Las muestras de pienso se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  y se compusieron para el posterior análisis de nutrientes. Todas las raciones se formularon para ser isoenergéticas e isonitrogenadas dentro de la relación forraje-concentrado (FCR) de la dieta, pero hubo algunas diferencias en la composición de los ingredientes, ya que las dietas SB tenían una cantidad ligeramente inferior de trigo y cebada que el resto, debido a la inclusión de bicarbonato sódico, y aún así alcanzaban los objetivos de energía y proteína.

La producción individual de leche en cada ordeño se determinó utilizando medidores electrónicos de leche (AfiMilk, Afikim Ltd.), y el contenido de grasa y proteína de la leche también se determinaron electrónicamente en cada ordeño mediante el sistema AfiLab (Afikim Ltd.), que se calibró quincenalmente.

**Tabla 1.** Composición nutricional y química de la ración mixta total para cada tratamiento dietético y periodo<sup>1</sup>

Item	Periodo 1			Periodo 2			Periodo 3			Periodo 4		
	Control	SB	MG	Control	SB	MG	Control	SB	MG	Control	SB	MG
Ingrediente, % of DM												
Heno de alfalfa	19.9	19.9	19.9	19.9	19.9	19.9	19.9	19.9	19.9	19.9	20.0	19.9
Heno de festuca	14.5	14.5	14.5	10.9	10.8	10.9	7.23	7.23	7.24	3.62	3.64	3.62
Heno de avena	7.23	7.95	7.24	7.25	7.95	7.24	7.23	7.95	7.24	7.23	7.29	7.24
Paja	5.54	5.55	5.55	5.56	5.54	5.55	5.54	5.55	5.55	5.55	5.59	5.55
Cebada	4.12	3.83	4.05	7.50	7.48	7.71	11.4	11.1	11.3	15.0	14.8	14.9
Maíz	33.9	33.9	33.7	34.0	33.9	33.7	33.9	33.9	33.7	33.9	34.2	33.7
Harina de soja	12.7	11.9	12.9	12.8	11.9	12.9	12.7	11.9	12.9	12.7	12.0	12.9
Trigo	0.72	0.29	0.58	0.72	0.29	0.58	0.72	0.29	0.58	0.72	0.29	0.58
Aceite de palma	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08
Cloruro de sodio	0.33	0.33	0.33	0.33	0.33	0.33	0.33	0.33	0.33	0.33	0.33	0.33
Carbonato de calcio	0.82	0.74	0.78	0.74	0.74	0.78	0.82	0.74	0.78	0.82	0.75	0.78
pHix-up <sup>2</sup>	—	—	0.25	—	—	0.25	—	—	0.25	—	—	0.25
Bicarbonato de sodio	—	0.82	—	—	0.82	—	—	0.82	—	—	0.82	—
Premix <sup>3</sup>	0.21	0.21	0.21	0.21	0.21	0.21	0.21	0.21	0.21	0.21	0.21	0.21
Nutriente, Base DM												
CP, %	15.9	15.5	15.9	16.0	15.6	16.0	16.0	15.7	16.1	16.1	15.8	16.2
NE <sub>L</sub> , Mcal/kg	1.66	1.65	1.66	1.67	1.66	1.67	1.69	1.68	1.69	1.71	1.70	1.70
NDF, %	32.2	32.2	32.2	30.8	30.9	30.7	29.3	29.5	29.3	27.9	27.9	27.9
ADF, %	19.0	19.1	19.0	18.0	18.1	17.9	16.9	17.0	16.9	15.8	15.8	15.8
Grasa, %	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6
Cenizas, %	7.3	8.1	7.6	7.0	7.80	7.3	6.8	7.5	7.0	6.6	7.3	6.8
NFC, %	42.0	41.5	41.8	43.6	43.1	43.4	45.3	44.7	45.0	46.9	46.5	46.6
Ca, %	0.85	0.84	0.85	0.84	0.81	0.83	0.82	0.79	0.81	0.80	0.78	0.79
P, %	0.34	0.34	0.36	0.33	0.32	0.34	0.36	0.34	0.33	0.36	0.33	0.36
Mg, %	0.21	0.21	0.35	0.21	0.21	0.35	0.21	0.21	0.34	0.20	0.21	0.34
Na, %	0.17	0.39	0.17	0.17	0.39	0.17	0.16	0.39	0.17	0.16	0.40	0.16
K, %	1.61	1.62	1.61	1.53	1.52	1.53	1.45	1.44	1.47	1.37	1.35	1.38
S, %	0.24	0.22	0.24	0.23	0.23	0.23	0.23	0.22	0.22	0.22	0.24	0.22
Cl, %	0.53	0.50	0.53	0.52	0.52	0.51	0.50	0.51	0.50	0.49	0.50	0.49
DCAD-S, mEq/100 g	18.6	30.6	18.6	17.5	26.8	17.8	15.6	25.7	17.2	14.4	22.8	14.7
DCAD-Mg, mEq/100 g	34.1	45.8	37.2	32.9	41.8	36.3	30.1	40.0	35.3	28.3	37.1	31.9
Forraje, %	47.1	47.9	47.2	45.1	44.2	43.5	39.8	40.6	39.9	36.2	36.6	36.3

<sup>1</sup>Control = sin suplementación; SB = suplementación de 0,82% (MS) de bicarbonato sódico; MG = suplementación de 0,25% de una mezcla de óxido de magnesio. Las 3 TMR diferían para el control, SB y MG en su DCAD-S (calculada considerando Na, K, Cl y S) o DCAD-Mg (calculada teniendo en cuenta la adición de Mg, Ca y P).

<sup>2</sup>Timab Magnesium.

<sup>3</sup>El Premix contenía 81,6 mg/kg de Zn; 11,5 mg/kg de Cu; 57,6 mg/kg de Mn; 9,86 mg/kg de Co; 1,92 mg/kg de I; 0,34 mg/kg de Se; 58 mg/kg de S; 120.000 UI/kg de vitamina A; 28.800 UI/kg de vitamina D; y 1.920 UI/kg de vitamina E.

Todas las vacas se pesaron diariamente a la salida de la sala de ordeño utilizando una báscula electrónica. Siete vacas por tratamiento se seleccionaron aleatoriamente antes del inicio del estudio y recibieron un bolo medidor del pH ruminal (SmaXtec Animal Care Sales GmbH) programado para registrar el pH ruminal a intervalos de 10 minutos. El número de vacas a muestrear se basó en un análisis de potencia para medidas repetidas como el descrito anteriormente, pero utilizando una potencia = 0,80,  $\alpha = 0,05$  y una desviación estándar esperada de 0,21 unidades. En el día 0 y cada 10 días, se recogió una muestra de líquido ruminal de 7 vacas por tratamiento (también seleccionadas aleatoriamente antes del inicio del estudio) a las 2 h de la alimentación matinal mediante una sonda gástrica. Las muestras se congelaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior extracción y procesamiento del ADN. El ADN del líquido ruminal se extrajo y purificó utilizando el método DNeasy PowerSoil Pro isolation kit (Qiagen)

siguiendo el procedimiento sugerido por el fabricante. Las concentraciones de ADN y su pureza se midieron por espectrofotometría utilizando un espectrofotómetro UV/Vis NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies Inc.) y el fluorómetro Qubit (Life Technologies). Se analizó un microgramo de ADN siguiendo el protocolo de secuenciación de ADN genómico de código de barras nativo 1D SQK-LSK109 (con EXP-NBD104 y EXP-NBD114) y kit de secuenciación de ligación (SQK-LSK109) de Oxford Nanopore Technologies utilizando el secuenciador GridION (Oxford Nanopore Technologies) y las celdas de flujo R9.4.1 (Oxford Nanopore Technologies). Se utilizó el kit de herramientas Guppy (Versión 6.1, Oxford Nanopore Technologies) para la llamada de bases y el demultiplexado. La media y la desviación estándar de la profundidad de secuenciación fue de  $407.161 \pm 82.031$  lecturas por muestra. A continuación, se aplicó un control de calidad para eliminar las secuencias con una puntuación de calidad <7 y una longitud <150 pb.

El análisis de secuencias se llevó a cabo utilizando el pipeline SqueezeMeta (sqm\_longreads, versión 1.6.0) para lecturas largas (Tamames y Puente-Sánchez, 2019), que realiza búsquedas Diamond Blastx contra la base de datos taxonómicos GenBank de Biotechnology Information (descargado el 12 de mayo de 2021, de www.ncbi.nlm.nih.gov) y, a continuación, identifica y anota marcos de lectura abiertos utilizando el método del ancestro común más bajo. Esta herramienta está diseñada específicamente para procesar lecturas largas de Oxford Nanopore Technologies. Las lecturas se procesaron en Blastx mediante el pipeline de lecturas largas SqueezeMeta. Se descartaron todas las secuencias mapeadas como no microbianas (es decir, virus, animales y plantas). Las secuencias microbianas se filtraron por prevalencia para reducir la dispersión de datos y los errores de secuenciación.

Cada 10 días, se tomaron muestras fecales directamente del recto de 7 vacas por tratamiento a las 2, 4 y 8 h de la alimentación matinal. Las muestras se compusieron por vaca y día para medir posteriormente el contenido de cenizas insolubles en ácido y FDN y calcular la digestibilidad de la FDN en el tracto total (Van Keulen y Young, 1977). De nuevo, el número de vacas a muestrear se basó en un análisis de potencia para medidas repetidas con una potencia = 0,80,  $\alpha = 0,05$  y una desviación estándar esperada para la digestibilidad aparente de la FDN de 1,5 unidades. El pH fecal se midió en cada ocasión inmediatamente después de la recogida. A todas las vacas se les tomó una muestra de sangre de la vena yugular utilizando vacutainers sin aditivos (Beckton Dickinson) en el día 0 y cada 10 días durante todo el estudio. Las muestras se mantuvieron refrigeradas hasta ser centrifugadas a  $1,50 \times g$  durante 10 min a temperatura ambiente y se almacenaron en alícuotas a  $-20^\circ\text{C}$  hasta el posterior análisis sérico de Ca, Cl, Na, K, P, Mg y haptoglobina. Las concentraciones séricas de Ca, P y Mg se determinaron utilizando el método del arsenazo III (Michaylova e Ilkova, 1971) y el método del fosfomolibdato, y por colorimetría directa utilizando la reacción del azul de xilidilo, respectivamente; las de Cl, Na y K se determinaron utilizando electrodos selectivos de iones (Levy, 1981); y las concentraciones séricas de haptoglobina se determinaron utilizando un método colorimétrico (Tridelta Development Ltd.).

Por último, se tomaron muestras de orina de todas las vacas mediante estimulación vulvar en el día 0 y cada 10 días a las 2, 4 y 6 h de la alimentación matinal y a las 2 h de la alimentación vespertina. El pH de la orina se midió inmediatamente (en los 5 minutos siguientes a la recogida) utilizando un medidor de pH de electrodo de vidrio, que se calibró diariamente a temperatura ambiente utilizando soluciones tampón de pH 4,01 y 7,00. El electrodo de vidrio se enjuagó y se lavó con agua tibia. El electrodo de vidrio se enjuagó con agua desionizada y se secó antes de cada uso. Al final del día, las 4 muestras de orina de cada vaca se compusieron y congelaron hasta su posterior análisis de creatinina, Ca y Mg.

La creatina en orina se determinó mediante análisis colorimétricos cinéticos basados en la reacción de Jaffe (Seaton y Ali, 1984). Las concentraciones de Ca y Mg en orina se determinaron mediante el método del arsenazo III (Michaylova e Ilkova, 1971) y por colorimetría directa utilizando azul de xilidilo, respectivamente. La ECM se calculó según NRC (1989), como

$$\text{ECM (kg/d)} = 12,55 \times \text{rendimiento en grasa (kg/d)} + 7,39 \times \text{rendimiento en proteínas (kg/d)} + 5,34 \times \text{rendimiento en lactosa (kg/d)}.$$

La diferencia catión-anión en la dieta se calculó siguiendo a Jackson et al. (2001), como

$$\begin{aligned} \text{DCAD-S (mEq/100 g)} &= \{[\text{Na (g/kg)/0.0023}] \\ &+ [\text{K (g/kg)/0.00391}] - \{[\text{Cl (g/kg)/0.00355}] \\ &+ [\text{S (g/kg)/0.00321}] \times 2\}. \end{aligned}$$

Asimismo, la DCAD-Mg (mEq/100g) se calculó siguiendo a Goff et al. (1997), como

$$\begin{aligned} \text{DCAD-Mg (mEq/100 g)} &= \{[\text{Na (g/kg)/0.0023}] \\ &+ [\text{K (g/kg)/0.00391}] + [0,38 \times \text{Ca (g/kg)/0.0020}] \\ &+ [0,30 \times \text{Mg (g/kg)/0.0012}] - \{[\text{Cl (g/kg)/0.00355}] \\ &+ [\text{S (g/kg)/0.00321}] \times 2 + [0,30 \text{ 0,50} \\ &\times \text{P (g/kg)/0.0017}]\}. \end{aligned}$$

La diversidad alfa (es decir, la diversidad dentro de una comunidad de una muestra animal) a nivel de género se calculó como el índice de Simpson inverso con la función estimate\_richness() de phyloseq (McMurdie y Holmes, 2013) en R (versión 4.1.3; R Core Team, 2022). La diversidad beta (es decir, la diversidad entre las comunidades de diferentes muestras de animales) en todas las muestras se calculó utilizando el índice de disimilitud de Bray-Curtis (Bray y Curtis, 1957) considerando la distancia euclidiana en la composición microbiana entre las muestras, y se realizó un análisis de gradiente para cada tratamiento utilizando un escalado multidimensional no métrico también a nivel de género. Por lo tanto, dada la métrica de distancia utilizada aquí, una  $\beta$ -diversidad alta indica un bajo grado de similitud en taxones específicos entre individuos dentro de un tratamiento dietético dado o FCR dietético.

Dado que los tratamientos se aplicaron a nivel animal, la unidad experimental fue el animal. Los datos del periodo basal de 7 días se promediaron dentro de cada vaca y se utilizaron como covariable, y los primeros 7 días de cada periodo se excluyeron del análisis. Se comprobó la normalidad de todos los datos y se transformaron a una distribución normal cuando los datos originales no seguían una distribución normal (según la prueba de Shapiro-Wilk), como fue el caso de las concentraciones séricas de haptoglobina.

**Tabla 2.** Rendimiento en función de un agente neutralizante y de la proporción forraje/concentrado en la dieta

Item	Agente neutralizante <sup>1</sup>				P-valor <sup>2</sup>		
	Control	SB	MG	SE	NA	FC	NA×FC
DMI, kg/d	24.1	24.0	24.8	0.40	0.28	0.06	0.05
Tiempo comida, min/d	193 <sup>b</sup>	221 <sup>a</sup>	215 <sup>a</sup>	4.40	<0.01	<0.01	<0.01
Tasa comida, g de DM/min	130 <sup>a</sup>	112 <sup>c</sup>	118 <sup>b</sup>	2.56	<0.01	<0.01	<0.01
Rendimiento leche, kg/d	38.5	38.9	38.5	0.58	0.84	<0.01	0.07
Grasa en leche, %	3.59	3.67	3.61	0.05	0.45	0.03	0.07
Grasa en leche, kg/d	1.37	1.43	1.38	0.02	0.09	<0.01	0.29
Proteína en leche, %	3.38	3.35	3.35	0.01	0.08	<0.01	0.44
Proteína en leche, kg/d	1.30	1.30	1.29	0.02	0.93	<0.01	0.43
ECM, kg/d	39.8	40.4	40.5	2.05	0.96	<0.01	0.09
Eficacia alimentaria <sup>2</sup>	1.67	1.70	1.66	0.09	0.95	0.19	0.04

<sup>a-c</sup>Los valores dentro de una fila con superíndices distintos difieren en  $P < 0,05$ .

<sup>1</sup>Control = sin suplementación; SB = suplementación de 0,82% (MS) de bicarbonato sódico; MG = suplementación de 0,25% de una mezcla de óxido de magnesio.

<sup>2</sup>NA = efecto del agente neutralizante; FC = efecto de la relación forraje/concentrado de la dieta; NA×FC = efecto de la interacción entre el agente neutralizante de la dieta y la relación forraje/concentrado.

<sup>3</sup>Calculado como ECM/DMI.

Los datos se sometieron a un modelo de efectos mixtos que incluía los efectos fijos del tratamiento, el periodo y sus interacciones bidireccionales, más el efecto aleatorio de la vaca utilizando SAS (Versión 9.4, 2016, SAS Institute Inc.). La estructura repetida se modeló utilizando el animal dentro del tratamiento como sujeto y una estructura de matriz de covarianza-varianza autorregresiva de orden 1. Se presentan las medias por mínimos cuadrados ( $\pm$  SEM). La separación de medias se realizó mediante el método de Tukey.

Para los registros de pH ruminal, los datos de los últimos 7 días de cada periodo se promediaron dentro de la vaca y la hora del día, y se ejecutó un modelo que tenía en cuenta los efectos fijos del tratamiento, el periodo, la hora y sus interacciones de 2 y 3 vías incluyendo la hora del día como medida repetida, el IMD diario total como covariable y la vaca dentro del periodo y el tratamiento como efecto aleatorio utilizando una matriz de covarianza-varianza autorregresiva de orden 1, que produjo el criterio de información bayesiano más pequeño entre las estructuras de covarianza-varianza probadas. Las interacciones entre periodo y hora y entre tratamiento, periodo y hora no fueron significativas ( $P > 0,18$ ); por tanto, todos los datos se promediaron por vaca, tratamiento y hora, y se aplicó un modelo de efectos mixtos que tenía en cuenta los efectos fijos del tratamiento, la hora y su interacción bidireccional, incluyendo la vaca dentro del tratamiento como efecto aleatorio.

Las diferencias de diversidad beta entre tratamientos se evaluaron mediante permanova (un análisis estadístico multivariante no paramétrico que utiliza permutaciones para evitar sesgos) en matrices de disimilitud de Bray-Curtis realizadas con 1.000 permutaciones.

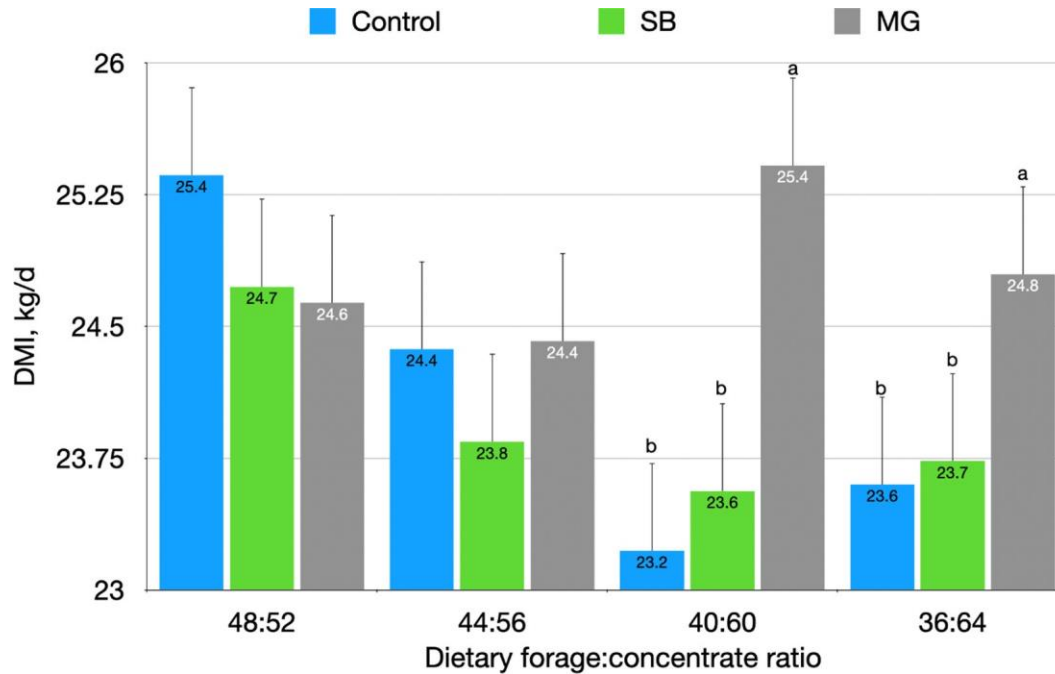
La abundancia relativa diferencial entre tratamientos se evaluó mediante un ANOVA multivariante con el paquete Limma (Ritchie et al., 2015) de R (versión 4.1.3; R Core Team, 2022) utilizando datos centrados y transformados logarítmicamente como entrada y corrigiendo las tasas de falsos descubrimientos (Benjamini y Hochberg, 1995). Los valores P ajustados a la tasa de falsos descubrimientos se muestran en todo el manuscrito.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

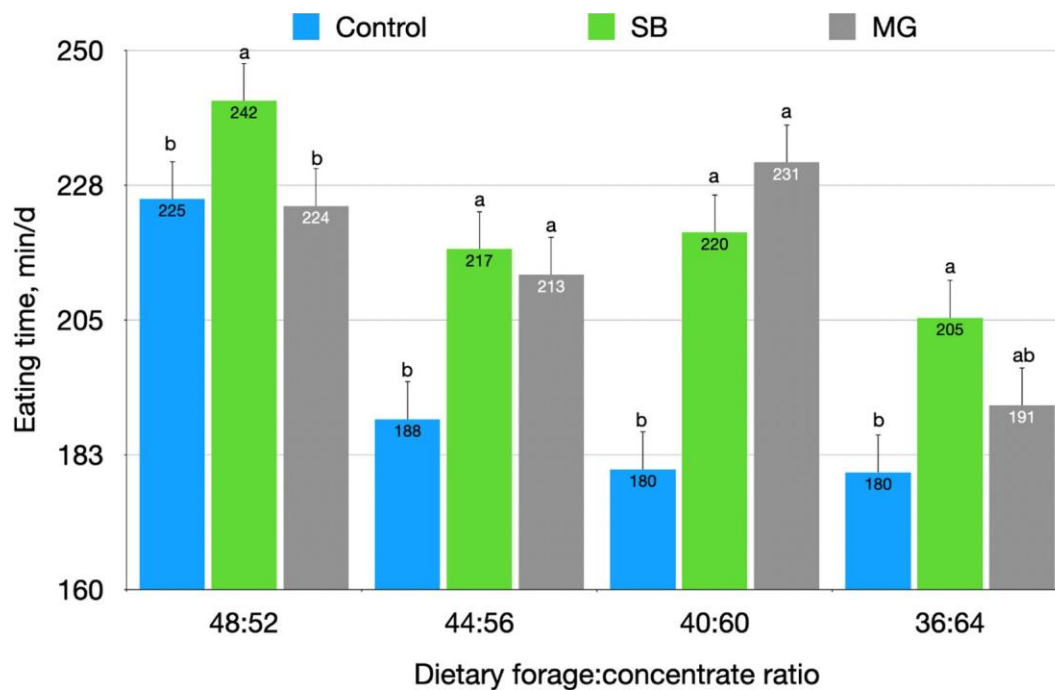
### Ingesta de alimento y comportamiento alimentario

El consumo de materia seca tendió ( $P = 0,06$ ) a disminuir de  $24,9 \pm 0,31$  a  $24,0 \pm 0,31$  kg/d a medida que disminuía el FCR de la dieta (Tabla 2). Las vacas control y SB consumieron menos ( $P = 0,046$ ) MS ( $23,5 \pm 0,31$  kg/d) que las MG ( $25,1 \pm 0,31$  kg/d) cuando el FCR de la dieta fue 44:56 y 40:60 (Figura 1). El tiempo que las vacas dedicaron a comer se vio afectado por una interacción entre el agente neutralizante de la dieta y el FCR de la dieta, mostrando las vacas control un menor tiempo para comer que las que recibieron SB o MG durante los periodos 2, 3 y 4 (Figura 2). Además, la cantidad diaria de tiempo que las vacas dedicaron a comer disminuyó de  $230 \pm 3,64$  a  $192 \pm 3,69$  min/d a medida que disminuía el FCR de la dieta, probablemente debido a la disminución concomitante de la DMI. Como consecuencia, la tasa de alimentación de las vacas control fue mayor que la de las vacas alimentadas con SB y MG a medida que la FCR de la dieta disminuía más allá de 48:52 (Figura 3). Anteriormente se había observado que el FCR dietético afectaba al IMD. La mayoría de los estudios informan de un aumento del IMD cuando disminuye el FCR de la dieta, lo que es opuesto a los hallazgos de este estudio. Por ejemplo, Kargar et al. (2010) informaron de un aumento de 2 kg en el IMD cuando el FCR disminuyó de 34:66 a 45:55, y tanto la FDN de la dieta como las concentraciones de energía neta de lactación se mantuvieron constantes entre las 2 dietas.

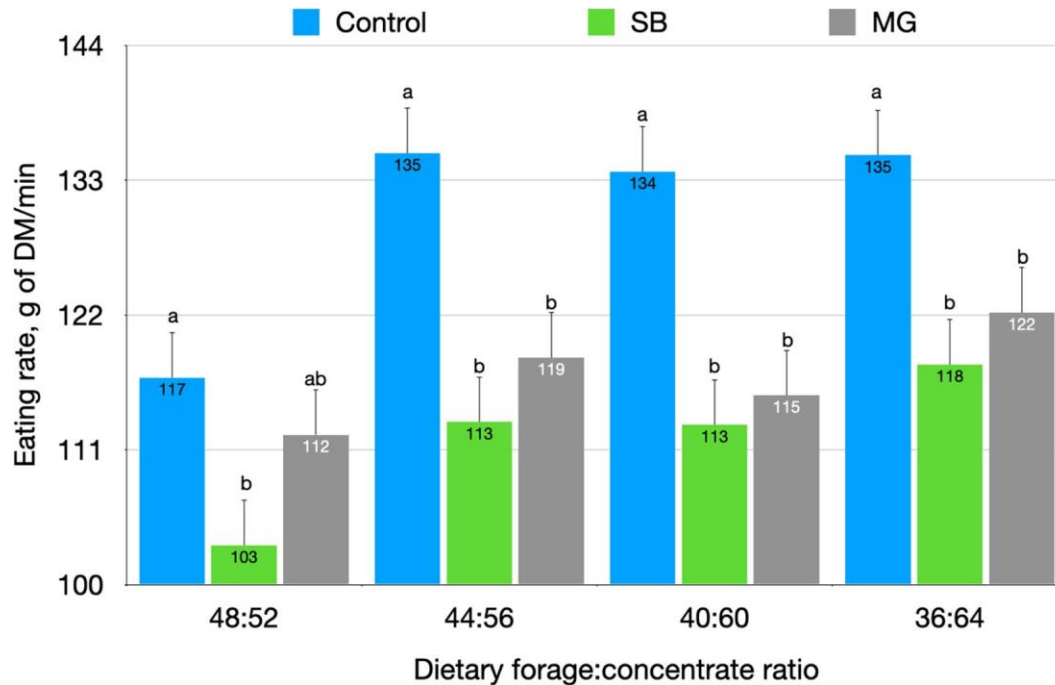
Bach et al.: NEUTRALIZING AGENTS AND RUMEN FERMENTATION



**Figura 1.** Consumo de materia seca en función del agente neutralizante y de la relación forraje/concentrado en la dieta. Control = sin suplementación; SB = suplementación de 0,82% (MS) de bicarbonato sódico; MG = suplementación de 0,25% de una mezcla de óxido de magnesio. <sup>a,b</sup>Las letras no comunes en la relación forraje/concentrado indican diferencias entre tratamientos a  $P < 0,05$ . Las barras de error denotan SEM. Las barras de error indican la SEM.



**Figura 2.** Tiempo dedicado a comer en función del agente neutralizante y de la proporción forraje/concentrado en la dieta. Control = sin suplementación; SB= suplementación de 0,82% (MS) de bicarbonato sódico; MG = suplementación de 0,25% de una mezcla de óxido de magnesio. <sup>a,b</sup>Las letras no comunes en la relación forraje/concentrado indican diferencias entre tratamientos a  $P < 0,05$ . Las barras de error denotan SEM. Las barras de error indican la SEM.

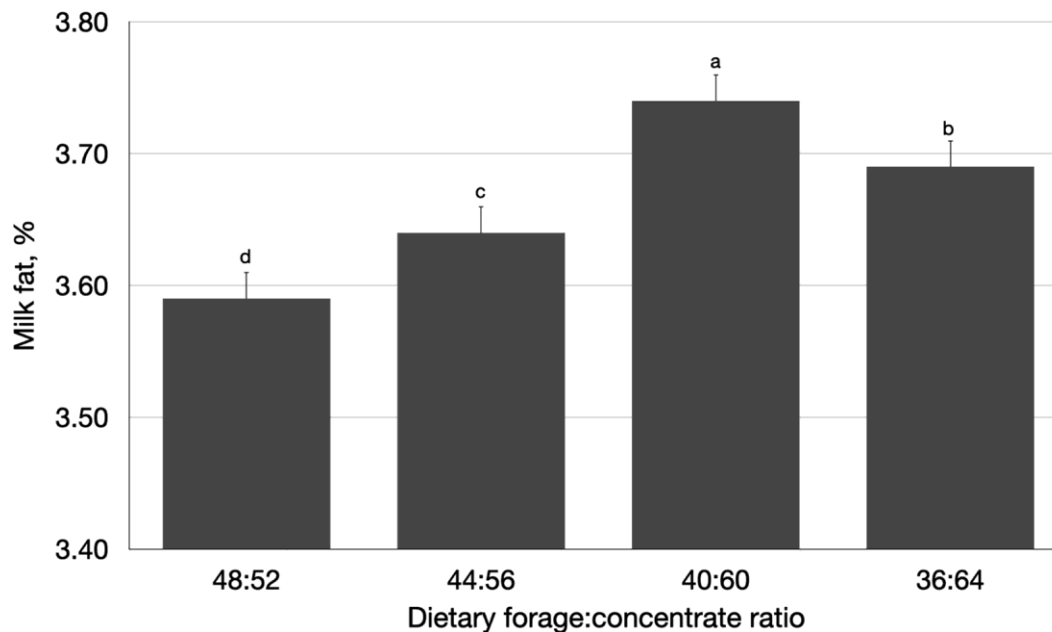


**Figura 3.** Tasa de ingestión en función del agente neutralizante y de la proporción forraje/concentrado en la dieta. Control = sin suplementación; SB = suplementación con 0,82% (MS) de bicarbonato sódico; MG = suplementación con 0,25% de una mezcla de óxido de magnesio. <sup>a,b</sup>Las letras no comunes en la relación forraje/concentrado indican diferencias entre tratamientos a  $P < 0,05$ . Las barras de error denotan SEM. Las barras de error indican la SEM.

Sin embargo, Olijhoek et al. (2018) también informaron de un aumento de aproximadamente 2 kg de DMI al reducir la FCR de 68:32 a 39:61, pero en este caso, la FDN de la dieta, el almidón y el contenido energético diferían entre las dietas. Por el contrario, Aguerre et al. (2011) no reportaron cambios en la DMI al comparar raciones que contenían FCR de 68:32 y 47:53. En el presente estudio, las diferencias en el FCR de la dieta se lograron mediante sustituciones progresivas repentinas de forraje por cebada en un intento de causar una ligera alteración en el ambiente ruminal. El almidón de la cebada se fermenta rápidamente en el rumen (Offner et al., 2003), y Oba y Allen (2003) demostraron que el suministro de almidón rápidamente fermentable reduce la DMI al promover la saciedad y reducir el tamaño de las comidas y aumentar la tasa de ingestión. Además, en el presente estudio, la reducción del FCR dietético dio lugar a una disminución del pH ruminal, y se ha demostrado que la acidosis ruminal dificulta la DMI (Gao y Oba, 2016). En este estudio, la tasa de ingestión aumentó a medida que disminuyó el FCR de la dieta, lo que apoyaría aún más el papel de los carbohidratos rápidamente fermentables en la modulación de la DMI. Greter et al. (2008) también informaron de un aumento de la tasa de ingesta a medida que disminuía el FCR de la dieta en novillas lecheras, y Friggens et al. (1998) y DeVries et al. (2009) también encontraron mayores tasas de ingesta cuando disminuyó el FCR en el ganado lechero.

Por otra parte, la alimentación con SB o MG anuló el efecto del FCR dietético en el aumento de la tasa de ingestión cuando el FCR dietético era más bajo (36:64), lo que puede sugerir que la tasa de ingestión no sólo está controlada por el FCR dietético o la fermentabilidad de la dieta, sino que también puede estar influenciada por las condiciones ruminales. De hecho, DeVries et al. (2009) describieron una disminución de la tasa de ingestión cuando las vacas experimentaban acidosis ruminal. En este caso, las vacas MG mostraron un marcado aumento en la tasa de ingestión cuando el FCR de la dieta fue de 36:64, mientras que las vacas control o SB no lo hicieron, lo que podría ser una consecuencia de un pH ruminal más estable observado en MG que en las vacas SB y control, como se discute a continuación.

Algunos expertos dudan en eliminar el bicarbonato sódico de las dietas porque causa una reducción de la DCAD (ya que la ración aporta menos Na) y algunos estudios han informado de una relación positiva (cuadrática) entre la DCAD-S y la DMI (Hu y Murphy, 2004; Hu et al., 2007; Iwaniuk y Erdman, 2015). En el presente estudio, la DCAD-S de la SB fue de 10 mEq/100 g o aproximadamente un 60% mayor que en los tratamientos control y MG. Según la ecuación de Iwaniuk y Erdman (2015), tal diferencia en DCAD-S debería resultar en unos 300 g/d adicionales de DMI en SB que en los tratamientos control o MG. Sin embargo, el IMD global no difirió entre tratamientos, y de hecho fue mayor en las vacas MG cuando el FCR de la dieta fue de 40:60 o 36:54 (Figura 1).



**Figura 4.** Contenido de grasa de la leche en función de la relación forraje/concentrado. <sup>a-d</sup> Las barras con letras distintas difieren en  $P < 0,05$ . Las barras de error indican el SEM.

Estos resultados sugieren que la posible disminución de la IMD causada por una menor DCAD-S en MG que en SB fue superada por el efecto positivo de un mejor entorno ruminal sobre la ingesta de alimento. Además, la DCAD-Mg fue sólo un 14% más baja en MG y un 24% más baja en el control que en SB, por lo que puede ser que una diferencia tan pequeña (14%) no tenga consecuencias en la ingesta de alimento, en cuyo caso, el uso de DCAD-Mg puede ser preferible a DCAD-S cuando se alimentan raciones con óxido de magnesio y sin bicarbonato de sodio e intentar inferir los efectos potenciales sobre el equilibrio catión-anión y la DMI.

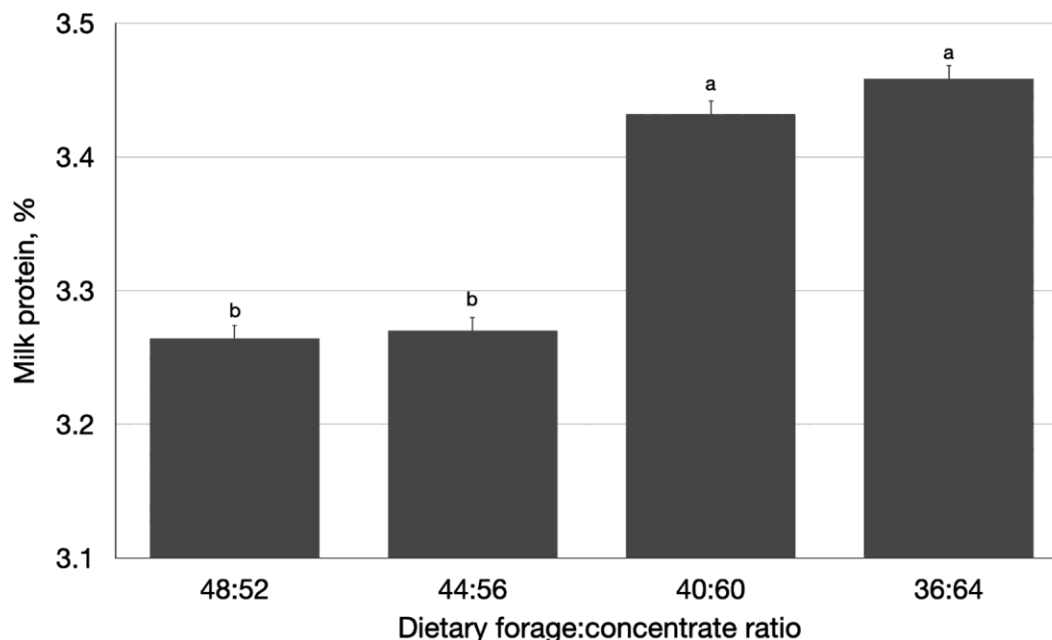
#### Rendimiento del ordeño

La producción de leche disminuyó de  $39,8 \pm 0,40$  a  $37,6 \pm 0,40$  kg/día y la ECM disminuyó de  $40,8 \pm 1,21$  a  $39,5 \pm 1,21$  kg/día a medida que disminuía la FCR de la dieta, independientemente de los tratamientos dietéticos (Tabla 2). El contenido de grasa láctea aumentó de  $3,59 \pm 0,03\%$  en el periodo 1 a  $3,74 \pm 0,03\%$  en el periodo 3, y luego disminuyó a  $3,69 \pm 0,03\%$  en el periodo 4, independientemente de los tratamientos dietéticos (Figura 4). A pesar del aumento del contenido de grasa láctea, el rendimiento en grasa láctea disminuyó de  $1,42 \pm 0,02$  a  $1,38 \pm 0,02$  kg/día a medida que disminuía el FCR dietético (Tabla 2). El contenido de grasa láctea y el rendimiento suelen reducirse cuando disminuye el FCR dietético (Macleod et al., 1983; Argov-Argaman et al., 2014; Machado et al., 2014). Sin embargo, el contenido de proteína láctea aumentó de 3,27 a 3,46% (Figura 5) y el rendimiento de proteína láctea de  $1,30 \pm 0,01$  a  $1,33 \pm 0,01$  kg/d (datos no mostrados) a medida que disminuía el FCR dietético.

Varios estudios han informado de que el aumento de las concentraciones de NFC en la dieta se traduce en un aumento del contenido de proteína de la leche y del rendimiento (Batajoo y Shaver, 1994; Oliveira et al., 2020). La eficiencia alimentaria (EF) no se vio afectada por los tratamientos, pero hubo una interacción entre el tratamiento y la RCF, ya que la EF disminuyó progresivamente en las vacas MG a medida que disminuía la RCF (Figura 6). Este cambio en la EF reflejó el aumento de la DMI en MG a medida que disminuía la FCR (Figura 1). Es posible que una exposición más prolongada a los tratamientos haya permitido a las vacas responder a las diferencias de IMD en términos de producción de leche o aumento corporal.

#### pH ruminal

El pH ruminal medio se vio influido por una interacción ( $P < 0,01$ ) entre el FCR de la dieta y un agente neutralizante que dio lugar a valores de pH ruminal más bajos en las vacas SB que en las vacas control y MG cuando el FCR de la dieta fue de 44:56 y a valores más bajos en las vacas control y SB que en las MG cuando el FCR de la dieta fue de 36:64 (Figura 7). Además, el pH ruminal medio disminuyó ( $P < 0,01$ ) de  $6,25 \pm 0,04$  a  $5,85 \pm 0,04$  a medida que disminuía la FCR de la dieta (Tabla 3). Del mismo modo, la proporción de tiempo que el pH ruminal de las vacas estuvo por debajo de 5,8 (un umbral a menudo considerado como una situación de acidosis ruminal subaguda) fue mayor ( $P < 0,05$ ) en las vacas SB que en las vacas control y MG cuando la FCR de la dieta fue 36:64 (Figura 8). Además, la proporción de tiempo en que el pH ruminal estuvo por debajo de 5,8 aumentó ( $P < 0,05$ ) de  $23,2 \pm 5,3\%$  a  $31,6 \pm 5,3\%$  a medida que disminuía el FCR de la dieta (Tabla 3).



**Figura 5.** Contenido de proteína láctea en función del agente neutralizante y de la proporción forraje-concentrado en la dieta. <sup>a,b</sup>Barras con letras distintas diferencian a  $P < 0,05$ . Las barras de error denotan SEM. Las barras de error denotan SEM.

A pesar de que, en teoría, la NC de la dieta SB debería ser equivalente a la del tratamiento MG (porque las cantidades de bicarbonato sódico y óxido de magnesio se ajustaron en función de sus respectivas NC), la MG fue capaz de mantener un mayor pH ruminal medio a lo largo del día y disminuir la cantidad de tiempo con un pH ruminal  $< 5,8$ , lo que sugiere un efecto más sostenido de la MG en el rumen en comparación con la SB.

De hecho, cuando se juntan todos los valores de pH de los últimos 7 días de cada período y se promedian por hora del día, se puede ver que las vacas SB tuvieron el mayor pH ruminal durante las primeras 2 a 3 h después de la alimentación de la mañana (Figura 9), pero luego, a partir de aproximadamente 4 h después de la alimentación de la mañana, las vacas MG tuvieron el mayor pH ruminal durante el resto del día, con las vacas control mostrando valores intermedios. Una posible razón para que las vacas control tuvieran valores de pH ruminal ligeramente superiores a los de las vacas SB podría ser que las vacas control consumieron menos pienso, y por tanto

menos materia fermentable, que las vacas SB. La figura 9 también representa la IMD acumulada a lo largo del día e ilustra que las vacas MG consumieron más pienso que las vacas control y SB durante la primera hora después de la alimentación matinal. Además, las vacas MG consumieron más pienso a las 16:00 y a las 17:00 horas que las vacas control, mientras que las SB mostraron un consumo acumulado intermedio.

#### Digestibilidad y Metabolismo

Hubo una interacción ( $P = 0,03$ ) entre el FCR dietético y el agente neutralizante en la digestibilidad aparente de los FDN del tracto total, con las vacas control y SB teniendo una digestibilidad más baja que las vacas MG cuando fueron alimentadas con un FCR dietético de 36:64 (Figura 10).

**Tabla 3.** El pH ruminal, urinario y fecal afectado por el agente neutralizante de la dieta y la proporción forraje-concentrado de la dieta.

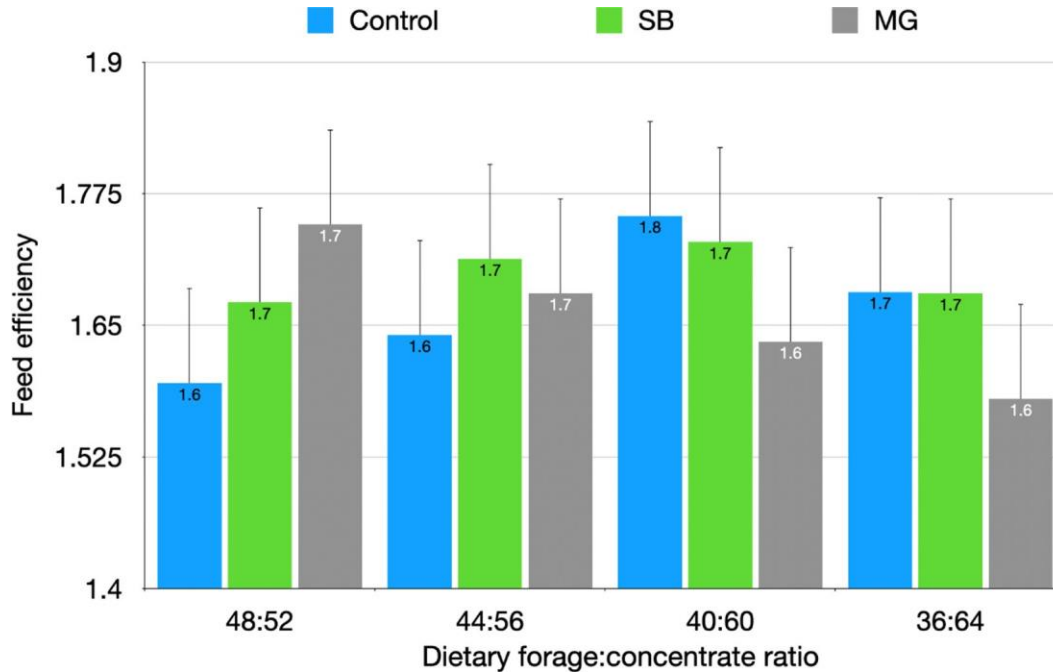
Item	Agente neutralizante <sup>1</sup>				P-valor <sup>2</sup>		
	Control	SB	MG	SE	NA	FC	NA×FC
pH ruminal	6.01	5.99	6.11	0.07	0.46	$<0.01$	$<0.01$
Proporción del día con pH ruminal $< 5.8$ , %	26.8	32.3	23.3	0.09	0.76	0.02	0.04
pH en orina	7.96 <sup>b</sup>	8.04 <sup>a</sup>	7.95 <sup>b</sup>	0.02	$<0.01$	$<0.01$	0.59
pH fecal	6.31 <sup>b</sup>	6.29 <sup>b</sup>	6.50 <sup>a</sup>	0.05	$<0.01$	$<0.01$	0.06

<sup>a,b</sup>Los valores dentro de una fila con superíndices distintos difieren en  $P < 0,05$ .

<sup>1</sup>Control = sin suplementación; SB = suplementación de 0,82% (MS) de bicarbonato sódico; MG = suplementación de 0,25% de una mezcla de óxido de magnesio.

<sup>2</sup>NA = efecto del agente neutralizante; FC = efecto de la relación forraje/concentrado de la dieta; NA×FC = efecto de la interacción entre el agente neutralizante de la dieta y la relación forraje/concentrado.

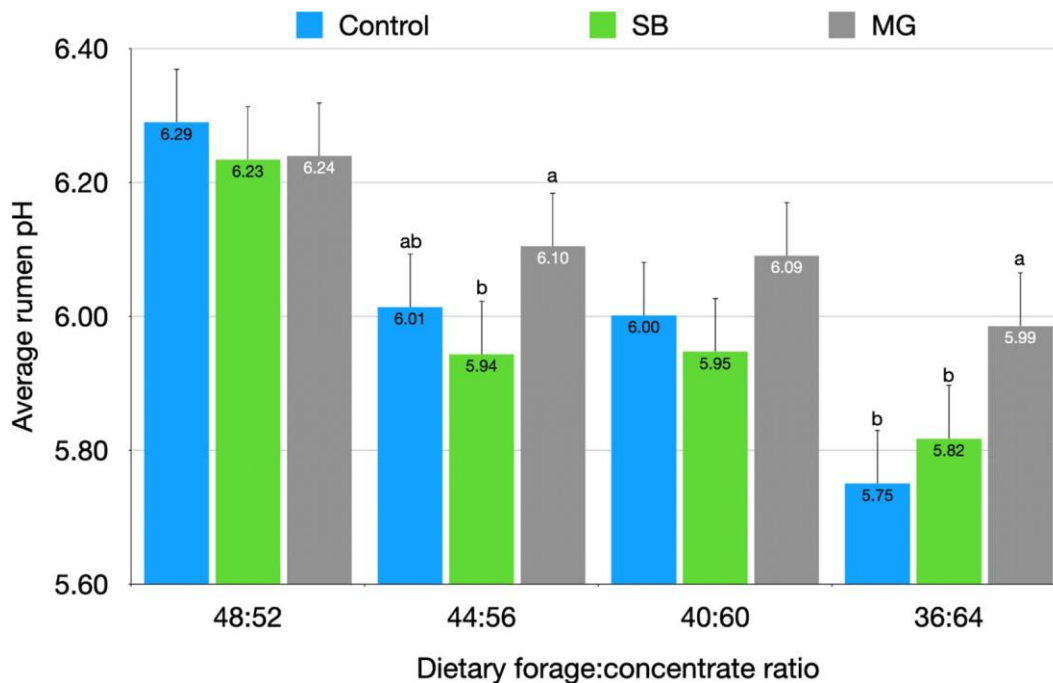
Bach et al.: NEUTRALIZING AGENTS AND RUMEN FERMENTATION



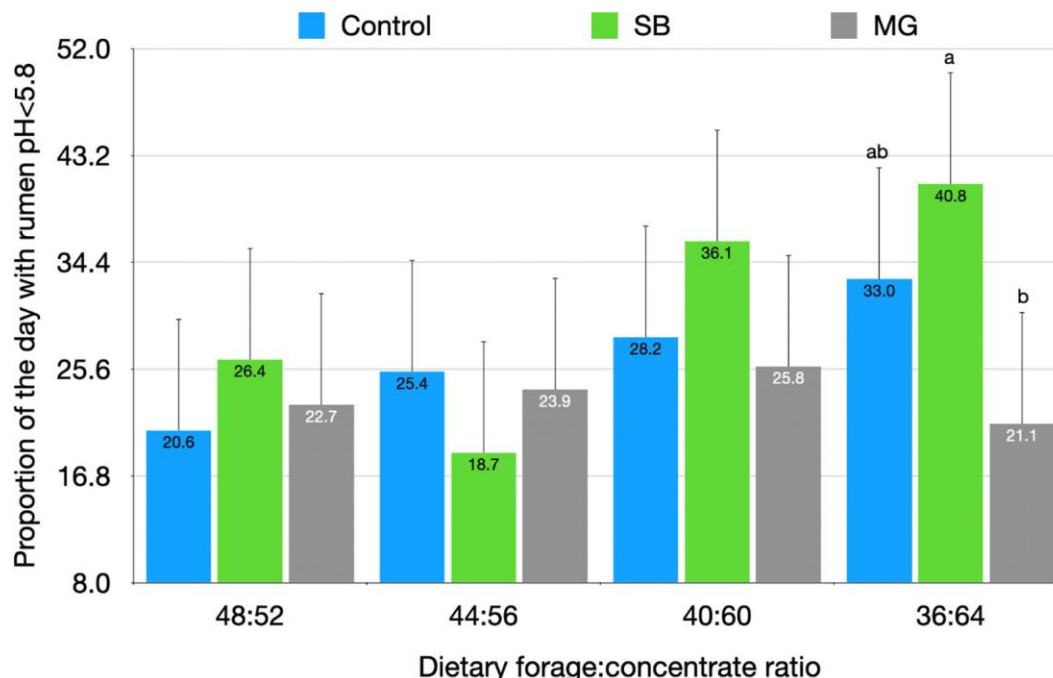
**Figura 6.** Eficacia alimentaria en función del agente neutralizante y de la relación forraje/concentrado en la dieta (interacción entre el agente neutralizante y la relación forraje/concentrado en la dieta:  $P < 0.05$ ). Control = sin suplementación; SB = suplementación de 0,82% (MS) de bicarbonato sódico; MG = suplementación de 0,25% de una mezcla de óxido de magnesio. Las barras de error indican la SEM.

Además, la digestibilidad aparente de la FDN en el tracto total disminuyó ( $P < 0,01$ ) de  $54,6 \pm 1,37\%$  a  $50,1 \pm 1,37\%$ , a  $46,6 \pm 1,37\%$ , a  $28,3 \pm 1,37\%$  a medida que la FCR de la dieta cambiaba de 48:52 a 44:56, a 40:60, a 36:64, respectivamente. Anteriormente se han reportado reducciones en la digestibilidad de la FDN a medida que aumenta el contenido de

FFC en la dieta (Batajoo y Shaver, 1994). Se cree que esta reducción se debe a (1) un pH ruminal bajo (Mould et al., 1983; Hoover, 1986; Calsamiglia et al., 2008) y (2) un aumento potencial en la tasa de paso resultante de un aumento potencial de la DMI (Kargar et al., 2010; Olijhoek et al., 2018).



**Figura 7.** pH ruminal medio en función del agente neutralizante y de la relación forraje/concentrado de la dieta. Control = sin suplementación; SB= suplementación de 0,82% (MS) de bicarbonato sódico; MG = suplementación de 0,25% de una mezcla de óxido de magnesio. <sup>a,b</sup>Las letras no comunes en la relación forraje/concentrado indican diferencias entre tratamientos a  $P < 0,05$ . Las barras de error denotan SEM. Las barras de error indican la SEM.



**Figura 8.** Efecto del agente neutralizante y de la relación forraje/concentrado en la dieta sobre la proporción de tiempo con pH ruminal <5,8. Control = sin suplementación; SB = suplementación de 0,82% (MS) de bicarbonato sódico; MG = suplementación de 0,25% de una mezcla de óxido de magnesio. <sup>a,b</sup>Las letras no comunes en la relación forraje/concentrado indican diferencias entre tratamientos a  $P < 0,05$ . Las barras de error denotan SEM. Las barras de error indican la SEM.

En el presente estudio, la DMI no aumentó; por lo tanto, la reducción en la digestibilidad aparente de la FDN en el tracto total no pudo atribuirse a una mayor tasa de pasaje. La reducción en la digestión de la fibra a pH bajo en el rumen se ha asociado con una reducción en la población microbiana fibrolítica causada principalmente por una menor capacidad de las bacterias fibrolíticas para adherirse a las partículas del alimento (Cheng et al., 1980) y a la lenta tasa de replicación de las bacterias fibrolíticas a pH bajo (Russell y Dombrowski, 1980). En este sentido, la mayor digestibilidad aparente de los FDN en el tracto total de las vacas MG en comparación con las vacas control o SB con un FCR dietético de 36:64 (o un NFC alto) podría atribuirse parcialmente a un pH ruminal relativamente mayor (Figuras 7 y 8). Esta hipótesis está respaldada por Yang et al. (2001), que no informaron de ningún cambio en la digestibilidad aparente de los FDN en el tracto total al comparar 2 FCR dietéticos cuando el pH ruminal no difería entre los tratamientos dietéticos.

El pH de la orina fue mayor ( $P < 0,01$ ) en las vacas SB independientemente del FCR de la dieta (Tabla 3), y disminuyó de  $8,03 \pm 0,02$  a  $7,96 \pm 0,02$  a medida que el FCR de la dieta disminuía de 48:52 a 36:64. Los estudios que informan de cambios en el pH de la orina no son concluyentes. En algunos estudios, las vacas con acidosis ruminal presentaron una disminución del pH de la orina (Danscher et al., 2015) y, en otros, las vacas con acidosis ruminal presentaron un aumento del pH de la orina (Li et al., 2012).

Parece que, como concluyen Enemark et al. (2004), el pH urinario puede no ser adecuado para predecir un pH ruminal bajo debido a la falta de una relación consistente entre los 2 parámetros. En cuanto al aumento del pH urinario en vacas SB, los informes en la literatura también son inconsistentes. Stokes et al. (1986) no describieron cambios en el pH de la orina en vacas alimentadas con raciones sin suplementos, con bicarbonato sódico al 0,7% o con bicarbonato sódico al 0,7% y óxido de magnesio al 0,28%. Sin embargo, Martins et al. (2021) informaron de un aumento del pH de la orina al suplementar a las vacas lecheras tanto con bicarbonato sódico (0,71% de la MS) como con óxido de magnesio (0,24% de la MS). Finalmente, Constable et al. (2019) describieron una relación negativa entre la concentración de Ca en orina y el pH urinario. En el presente estudio, las concentraciones de Ca en orina fueron más bajas en las vacas SB (Tabla 4), pero el pH de la orina fue mayor en estas vacas (Tabla 3); por lo tanto, tal vez el aumento del pH de la orina puede haber estado relacionado con cambios en el metabolismo del Ca inducidos por el bicarbonato de sodio en lugar de cambios en el pH del rumen, como se discute más adelante. Por el contrario, el pH fecal fue mayor en las vacas MG (Tabla 3), y fue mayor con la dieta que contenía un FCR de 44:56. Estudios previos han reportado incrementos en el pH fecal cuando se suplementa la dieta con óxido de magnesio (Erdman et al., 1982; Thomas et al., 1984; Stokes et al., 1986).

La concentración sérica de Ca fue sistemáticamente inferior en las vacas SB y MG que en las vacas control (Tabla 4), y disminuyó de  $2,37 \pm 0,02$  a  $2,33 \pm 0,02$  mM a medida que disminuía la FCR de la dieta (Tabla 4) independientemente de los tratamientos.

**Tabla 4.** Concentración de minerales seleccionados y haptoglobina en suero en función del agente neutralizante y de la proporción forraje-concentrado en la dieta

Item	Agente neutralizante <sup>1</sup>				P-valor <sup>2</sup>		
	Control	SB	MG	SE	NA	FC	NA×FC
Calcio, mM	2.39 <sup>a</sup>	2.33 <sup>b</sup>	3.32 <sup>b</sup>	0.02	0.02	0.03	0.31
Cloruro, mM	96.6 <sup>ab</sup>	97.4 <sup>a</sup>	96.3 <sup>b</sup>	0.29	0.03	<0.01	0.85
Fósforo, mM	1.93	1.91	1.91	0.05	0.92	0.07	0.23
Magnesio, mM	0.88	0.90	0.89	0.01	0.68	0.62	0.95
Potasio, mM	4.35	4.32	4.26	0.05	0.23	0.06	0.07
Sodio, mM	137.3 <sup>a</sup>	137.7 <sup>a</sup>	136.5 <sup>b</sup>	0.25	<0.01	<0.01	0.70
Haptoglobina, mg/dL	0.18	0.24	0.24	0.05	0.29	0.82	0.95

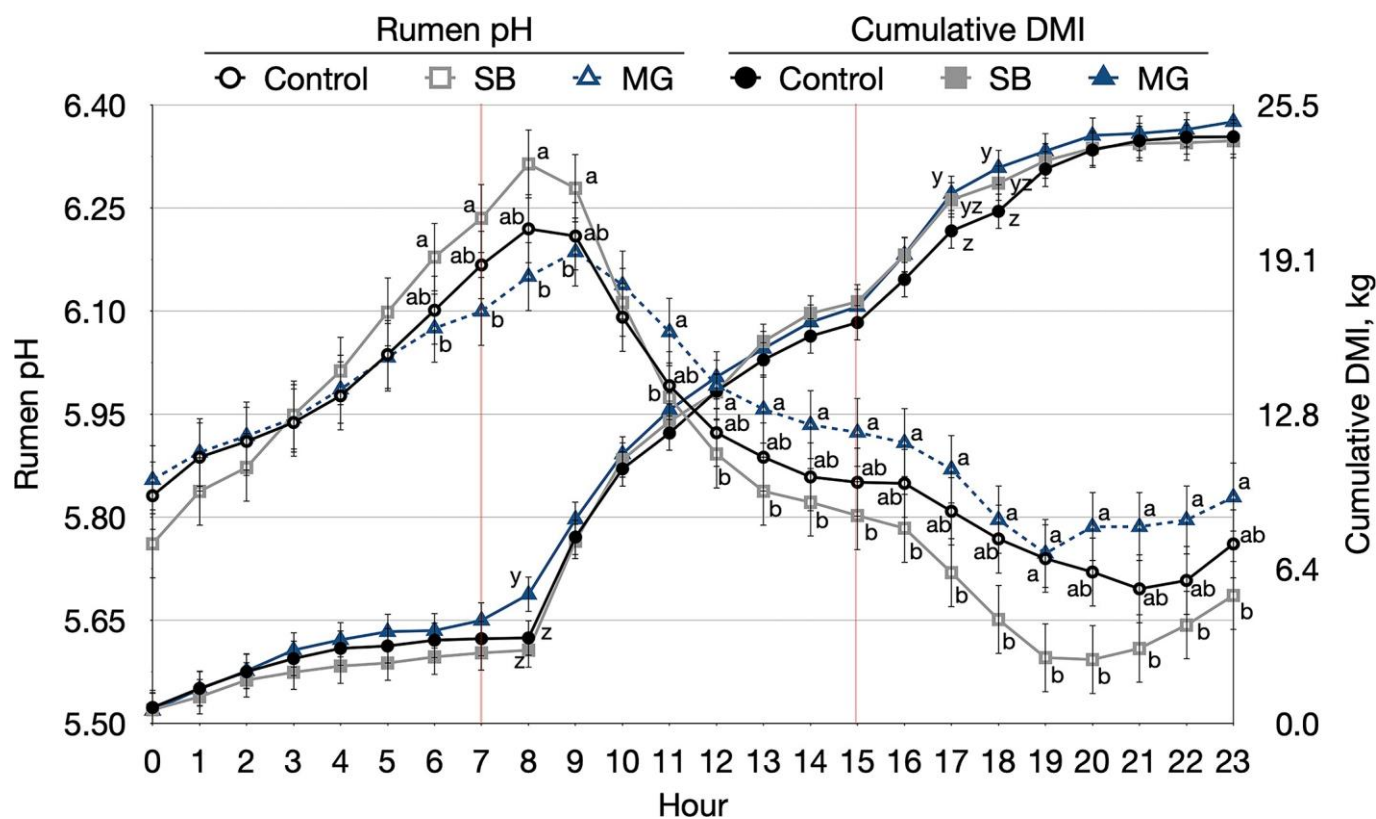
<sup>a,b</sup>Los valores dentro de una fila con superíndices distintos difieren en  $P < 0,05$ .

<sup>1</sup>Control = sin suplementación; SB = suplementación de 0,82% (MS) de bicarbonato sódico; MG = suplementación de 0,25% de una mezcla de óxido de magnesio.

<sup>2</sup>NA = efecto del agente neutralizante; FC = efecto de la relación forraje/concentrado de la dieta; NA×FC = efecto de la interacción entre el agente neutralizante de la dieta y la relación forraje/concentrado.

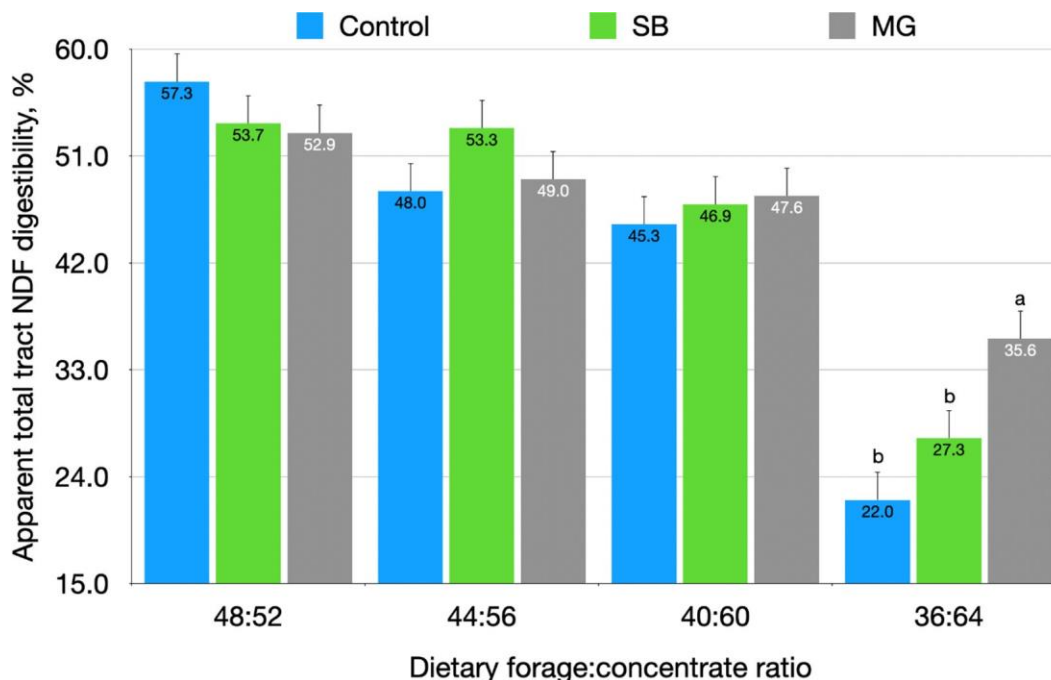
Al contrario de lo observado aquí, un par de estudios (Kilmer et al., 1981) informaron de una tendencia o una disminución significativa de las concentraciones séricas de Ca al suplementar a las vacas lecheras con bicarbonato sódico.

Sin embargo, Erdman et al. (1980) y Rogers et al. (1985) también reportaron una disminución en las concentraciones séricas de Ca al suplementar bicarbonato de sodio, como se observó aquí. La disminución de las concentraciones séricas de Ca a medida que disminuyó el FCR dietético aquí es consistente con las observaciones de otros (Patra et al., 1993; Stefanska et al., 2018).



**Figura 9.** Efecto del agente neutralizante y de la relación forraje/concentrado en la dieta sobre el pH ruminal y la IMD acumulada a lo largo del día. Las líneas verticales indican las horas del día en que se suministró el alimento. Control = sin suplementación; SB = suplementación de 0,82% (MS) de bicarbonato sódico; MG = suplementación de 0,25% de una mezcla de óxido de magnesio. <sup>a,b</sup>Las letras no comunes dentro de una misma hora indican diferencias en el pH ruminal entre tratamientos a  $P < 0,05$ . <sup>y,z</sup>Las letras no comunes dentro de una misma hora indican diferencias en la ingesta acumulada de alimento entre tratamientos a  $P < 0,05$ . Las barras de error indican SEM.

Bach et al.: NEUTRALIZING AGENTS AND RUMEN FERMENTATION



**Figura 10.** Efecto del agente neutralizante y de la proporción forraje-concentrado en la digestibilidad aparente de la FDN en el tracto total. Control = sin suplementación; SB = suplementación con 0,82% (MS) de bicarbonato sódico; MG = suplementación con 0,25% de una mezcla de óxido de magnesio. <sup>a,b</sup>Las letras no comunes en la relación forraje-concentrado indican diferencias entre tratamientos a  $P < 0,05$ . Las barras de error indican SEM. Las barras de error indican la SEM.

Aunque las rutas fisiológicas que participan en la reducción del Ca plasmático como consecuencia de una disminución del pH ruminal no se conocen bien, se ha especulado que el Ca puede ser eliminado de la sangre como parte de la respuesta inmune para facilitar la desintoxicación de endotoxinas que podrían ser liberadas debido a un pH ruminal bajo (Zebeli et al., 2010). Las concentraciones séricas de Cl fueron mayores en las vacas SB y menores en las MG, mientras que las vacas control presentaron concentraciones intermedias. Además, las concentraciones séricas de Cl aumentaron de  $94,9 \pm 0,23$  a  $98,1 \pm 0,23$  mM a medida que disminuía el FCR de la dieta, independientemente de los tratamientos dietéticos. Esta observación no concuerda con Li et al. (2012), que informaron de una tendencia a la disminución del Cl sérico tras inducir un desafío de acidosis ruminal en el ganado. Las concentraciones séricas de P no se vieron afectadas por los tratamientos ni por los periodos. Las concentraciones séricas de Mg no se vieron afectadas por el agente neutralizante ni por la FCR. Sin embargo, los primeros estudios informaron que la adición de bicarbonato de sodio redujo las concentraciones plasmáticas de Mg (Erdman et al., 1982; Teh et al., 1985). Las concentraciones séricas de Na fueron las más bajas en vacas MG, y aumentaron de  $136,4 \pm 0,24$  a  $138,2 \pm 0,24$  mM a medida que disminuía la FCR dietética, independientemente del tratamiento dietético. Anteriormente se había descrito un aumento de las concentraciones séricas de Na al suplementar a las vacas con bicarbonato sódico (Emery y Brown, 1961), pero, de nuevo, en algunos estudios no se ha observado este aumento (Escobosa et al., 1984).

También, como se ha observado aquí, Patra et al. (1993) informaron de un aumento del Na sérico al inducir la acidosis ruminal. No se observaron diferencias en las concentraciones séricas de K entre tratamientos o periodos.

En el presente estudio, no se observaron diferencias en las concentraciones séricas de haptoglobina (Tabla 4) entre tratamientos o FCR dietario. Las concentraciones séricas elevadas de haptoglobina se han relacionado con la inflamación y se ha observado que aumentan con la acidez ruminal (Gozho et al., 2005). Sin embargo, la haptoglobina es una proteína de fase aguda que reacciona más lentamente y, por lo tanto, refleja la presencia de condiciones inflamatorias crónicas (Plaizier et al., 2008). Quizás el cambio en el pH del rumen obtenido en este estudio no fue lo suficientemente severo como para provocar una fuerte respuesta inflamatoria. La producción diaria de orina no difirió entre tratamientos (Tabla 5). Las concentraciones de Ca en orina fueron mayores en las vacas control, intermedias en las MG y menores en las SB, y aumentaron de  $0,9 \pm 0,10$  a  $1,21 \pm 0,10$  mM en todas las vacas a medida que disminuía el FCR de la dieta, independientemente del tratamiento. Como resultado, la excreción urinaria de Ca fue menor en las vacas SB, y aumentó de  $0,96 \pm 0,11$  a  $1,29 \pm 0,11$  g/d en todas las vacas a medida que disminuía la FCR de la dieta, independientemente del tratamiento. Una vez más, el aumento de la excreción urinaria de Ca con la disminución de la FCR podría estar relacionado con una respuesta inmune a la disminución del pH del rumen (Zebeli et al., 2010).

**Tabla 5.** Concentración y excreción de calcio y magnesio en orina en función del agente neutralizante y de la proporción forraje-concentrado en la dieta

Item	Agente neutralizante <sup>1</sup>				P-valor <sup>2</sup>		
	Control	SB	MG	SE	NA	FC	NA×FC
Creatinina, mg/dL	71.0 <sup>a</sup>	69.4 <sup>a</sup>	59.2 <sup>b</sup>	3.22	0.03	0.24	0.18
Producción de orina, kg/d	30.0	26.8	32.2	2.80	0.52	0.97	0.16
Calcio, mM	1.231 <sup>a</sup>	0.68 <sup>b</sup>	0.9 <sup>b</sup>	0.10	<0.01	<0.01	0.31
Producción de calcio, g/d	1.31 <sup>a</sup>	0.69 <sup>b</sup>	1.06 <sup>a</sup>	0.12	<0.01	<0.01	0.23
Magnesio, mM	12.6 <sup>b</sup>	12.2 <sup>b</sup>	15.8 <sup>a</sup>	0.98	<0.01	0.02	0.56
Producción de magnesio, g/d	7.53 <sup>b</sup>	7.40 <sup>b</sup>	11.70 <sup>a</sup>	0.47	<0.01	0.02	0.11

<sup>a,b</sup>Los valores dentro de una fila con superíndices distintos difieren en  $P < 0,05$ .

<sup>1</sup>Control = sin suplementación; SB = suplementación de 0,82% (MS) de bicarbonato sódico; MG = suplementación de 0,25% de una mezcla de óxido de magnesio.

<sup>2</sup>NA = efecto del agente neutralizante; FC = efecto de la relación forraje/concentrado de la dieta; NA×FC = efecto de la interacción entre la capacidad neutralizante de la dieta y la relación forraje/concentrado.

Sin embargo, la menor excreción urinaria de Ca en las vacas SB concuerda con estudios anteriores (Kilmer et al., 1981; Rogers et al., 1985, Tucker et al., 1993) y podría estar relacionada con el aporte adicional de Na por el bicarbonato sódico (Takagi y Block, 1988). Por último, las concentraciones de Mg en orina fueron mayores en las vacas MG, lo que puede estar relacionado con el Mg adicional aportado en esta dieta. Además, la concentración de Mg en orina aumentó de  $13,1 \pm 0,69$  a  $14,6 \pm 0,69$  mM a medida que disminuía el FCR dietético, independientemente del tratamiento; en consecuencia, la excreción urinaria de Mg aumentó de  $8,4 \pm 0,37$  a  $9,2 \pm 0,37$  g/d a medida que disminuía el FCR dietético. El aumento de la excreción urinaria de Mg puede ser el resultado de una mayor absorción de Mg de la dieta en el rumen porque la concentración dietética de K disminuyó a medida que disminuyó la FCR de la dieta, y las concentraciones elevadas de K en el rumen inhiben la absorción activa de Mg (Leonhard-Marek et al., 2010).

### Microbioma ruminal

La diversidad alfa no se vio afectada por el FCR de la dieta, pero se redujo ( $P < 0,05$ ) en las vacas SB independientemente del FCR de la dieta. La diversidad alfa, medida como el índice de Simpson inverso, fue mayor ( $P < 0,1$ ) en las vacas MG ( $9,56 \pm 0,30$ ) y control ( $8,95 \pm 0,31$ ), mientras que las vacas SB tuvieron la diversidad más baja ( $7,84 \pm 0,30$ ), independientemente del FCR de la dieta (Figura 11). Pocos estudios han evaluado los efectos potenciales de los moduladores del pH ruminal sobre el microbioma del rumen. Ramos et al. (2021) informaron de un aumento numéricamente progresivo de la  $\alpha$ -diversidad a medida que aumentaba la proporción de óxido de magnesio en la dieta, y varios estudios han descrito una disminución de la  $\alpha$ -diversidad bajo acidosis ruminal subaguda (Fernando et al., 2010; Mao et al., 2013; Petri et al., 2013), aunque otros no han informado de ningún cambio (McGovern et al., 2020).

La Tabla 6 muestra los valores de  $\beta$ -diversidad (calculados como distancia desde el centroide del grupo) en el microbioma del rumen. En este caso, una  $\beta$ -diversidad alta indica un bajo grado de similitud en taxones específicos entre individuos dentro de un tratamiento dietético o FCR dietético dado. El microbioma del rumen en todos los niveles de taxones evaluados (de filo a género) fue más similar (es decir, menor  $\beta$ -diversidad) entre los individuos dentro del tratamiento MG que entre los individuos en los tratamientos control y SB. Sin embargo, la  $\beta$ -diversidad aumentó a medida que disminuía el FCR de la dieta, independientemente del tipo de agente neutralizante administrado, lo que indica que, a medida que aumentaba el desafío del concentrado, aumentaba la disimilitud en las poblaciones microbianas entre los individuos dentro del tratamiento dietario (en todos los taxones evaluados), lo que podría deberse a las diferentes respuestas del hospedador al desafío dietético.

Tanto el agente neutralizante como el FCR dietético afectaron a la abundancia relativa de los diferentes filos en el rumen (Figura 12). La abundancia relativa de *Bacteroidetes* fue mayor en el rumen de las vacas control y SB, y fluctuó a lo largo de la FCR de la dieta, observándose los valores más bajos en 44:45 (Figura 12). La alta abundancia relativa ruminal de *Bacteroidetes* se ha relacionado con una alta EF en el ganado lechero (Delgado et al., 2019). La abundancia relativa ruminal de *Firmicutes* no se vio afectada por el tipo de agente neutralizante, pero fluctuó a lo largo de la FCR dietética (Figura 12). La abundancia relativa en el rumen de *Fibrobacteres*, un filo que contiene una serie de bacterias fibrolíticas, fue mayor en las vacas MG, y su abundancia disminuyó progresivamente a medida que aumentaba el FCR de la dieta, independientemente del agente neutralizante (Figura 12). Se ha informado de que las bacterias de este filo son sensibles al pH bajo (Li et al., 2017). Dentro del filo *Fibrobacteres*, el género *Fibrobacter* fue más abundante ( $P$  ajustado  $< 0,05$ ) en las vacas MG que en las SB, independientemente del FCR de la dieta (Tabla suplementaria S5). Asimismo, dentro del filo *Spirochaetota*, *Treponema* fue más abundante ( $P$  ajustada  $< 0,05$ ) en las vacas MG que en las SB, independientemente de la FCR de la dieta (Tabla suplementaria S5).

**Table 6.** Efectos del agente neutralizante y de la relación forraje-concentrado (FCR) de la dieta sobre la  $\beta$ -diversidad (distancia media al centroide) del microbioma del rumen, calculada como distancia a los centroides de los grupos.

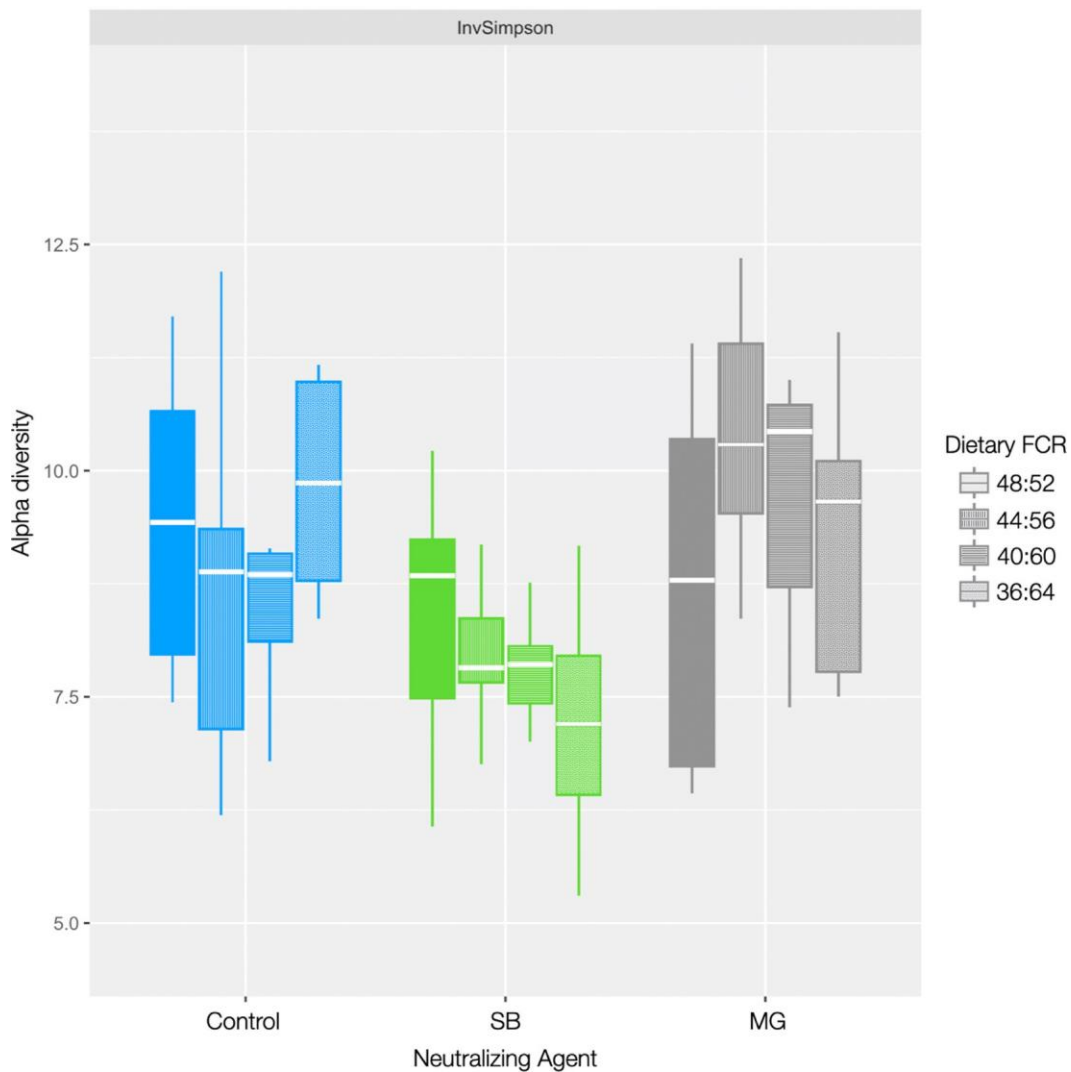
Taxón	Agente neutralizante			FCR en la dieta				<i>P</i> -valor <sup>1</sup>		
	Control	SB	MG	48:52	44:56	40:60	36:64	NA	FC	NA × FC
Filo	6.14 <sup>a</sup>	6.24 <sup>a</sup>	5.65 <sup>b</sup>	5.37 <sup>y</sup>	5.90 <sup>xy</sup>	6.21 <sup>x</sup>	6.50 <sup>x</sup>	0.01	0.02	0.83
Clase	8.34 <sup>a</sup>	8.44 <sup>a</sup>	7.77 <sup>b</sup>	7.31 <sup>y</sup>	8.19 <sup>x</sup>	8.49 <sup>x</sup>	8.60 <sup>x</sup>	<0.01	<0.01	0.79
Orden	12.93 <sup>a</sup>	12.64 <sup>ab</sup>	12.09 <sup>b</sup>	11.72 <sup>y</sup>	12.51 <sup>xy</sup>	12.75 <sup>x</sup>	13.0 <sup>x</sup>	<0.01	<0.01	0.36
Familia	17.65 <sup>a</sup>	17.19 <sup>ab</sup>	16.61 <sup>b</sup>	16.28 <sup>y</sup>	17.09 <sup>xy</sup>	17.47 <sup>xy</sup>	17.60 <sup>x</sup>	<0.01	<0.01	0.41
Género	23.65 <sup>a</sup>	22.69 <sup>ab</sup>	21.99 <sup>b</sup>	22.02 <sup>y</sup>	22.64 <sup>xy</sup>	23.14 <sup>xy</sup>	23.50 <sup>x</sup>	<0.01	<0.01	0.50

<sup>a,b</sup>Valores dentro de filas bajo capacidad neutralizante con superíndices no comunes difieren en  $P < 0,05$ .

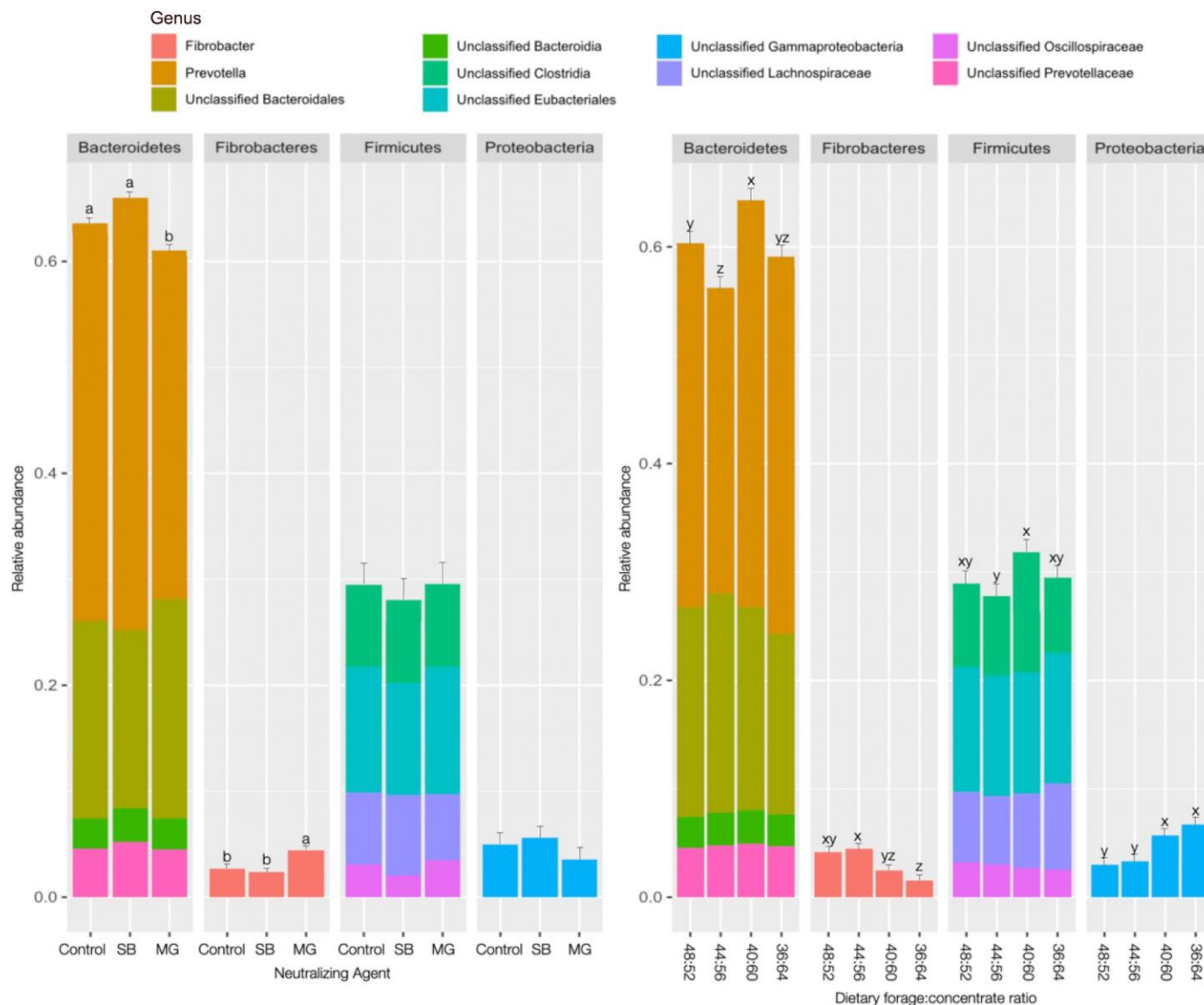
<sup>x,y</sup>Los valores dentro de las filas bajo FCR dietético con superíndices no comunes difieren en  $P < 0,05$ .

<sup>1</sup>Control = sin suplementación; SB = suplementación de 0,82% (MS) de bicarbonato sódico; MG = suplementación de 0,25% de una mezcla de óxido de magnesio.

<sup>2</sup>Los *P*-valores corresponden a un análisis permanova. NA = efecto del agente neutralizante; FC = efecto del FCR de la dieta; NA × FC = efecto de la interacción entre la capacidad neutralizante de la dieta y el FCR.



**Figura 11.** Diversidad alfa (medida como índice de Simpson inverso, InvSimpson) en función del agente neutralizante y de la relación forraje/concentrado (FCR) de la dieta. Control = sin suplementación; SB = suplementación con 0,82% (MS) de bicarbonato sódico; MG = suplementación con 0,25% de una mezcla de óxido de magnesio. Los bordes inferior y superior de cada recuadro representan el primer y tercer cuartil, la línea media muestra la mediana y los bigotes se extienden desde los valores mínimos a los máximos.



**Figura 12.** Abundancia relativa de *Bacteroidetes*, *Fibrobacteres*, *Firmicutes* y *Proteobacterias* en función del agente neutralizante y de la proporción forraje/concentrado en la dieta. Control = sin suplementación; SB = suplementación de 0,82% (MS) de bicarbonato sódico; MG = suplementación de 0,25% de una mezcla de óxido de magnesio. <sup>a,b</sup>Letras no comunes dentro de un filo indican diferencias entre agentes neutralizantes a  $P < 0,05$ . <sup>x,z</sup>Las letras no comunes dentro del filo indican diferencias entre las proporciones de forraje dietético y concentrado a  $P < 0,05$ . Las barras de error denotan SEM. Las barras de error indican el SEM.

Estos 2 géneros están fuertemente implicados en la degradación de la fibra en el rumen, y sus abundancias son típicamente elevadas en dietas altas en forraje (Petri et al., 2013). La mayor abundancia de *Fibrobacter* y *Treponema* en las vacas MG que en las SB podría ser una de las razones por las que las vacas MG tuvieron una mayor digestibilidad de FDN en el tracto total que las vacas control y SB a medida que disminuía el FCR dietético (Figura 10). Finalmente, la abundancia relativa de *Proteobacterias* en el rumen aumentó con FCR dietético de 40:60 y 36:64, independientemente del agente neutralizante en la dieta (Figura 12). Se han descrito observaciones similares cuando se comparan dietas con bajo contenido en grano frente a dietas con alto contenido en grano.

Por ejemplo, Petri et al. (2013) informaron de un aumento del 20% en la abundancia de *proteobacterias* 12 h después de un desafío de acidosis ruminal.

En cuanto a las bacterias amilolíticas, no se vieron afectadas por el agente neutralizante, pero sus abundancias relativas aumentaron, en general, a medida que disminuía el FCR de la dieta. El género *Weissella* (un microorganismo productor de ácido láctico) aumentó progresivamente ( $P$  ajustado  $< 0,05$ ) a medida que disminuía el FCR de la dieta (Tablas Suplementarias S6 a S10) independientemente del tratamiento. Del mismo modo, las abundancias relativas en el rumen de *Selenomonas* y *Butyrivibrio*, 2 géneros amilolíticos importantes, fueron mayores cuando las vacas consumieron un FCR dietético de 40:60 que un FCR de 44:56 y mayores con un FCR dietético de 36:64 que un FCR de 44:56 (Tablas suplementarias S8 y S9), independientemente del tratamiento.

Por último, la abundancia relativa en el rumen de *Ruminococcus*, otro importante género amilolítico, también fue mayor cuando se alimentó con una dieta FCR de 36:64 que con una FRC de 48:52 (Tabla Suplementaria S7).

### CONCLUSIONES

Con reducciones progresivas del FCR dietético, la ingesta de alimento tendió a disminuir y la ECM a aumentar, independientemente de los tratamientos dietéticos. Cuando se suministró un FCR dietético de 44:56 o 40:60, la ingesta de alimento fue menor en las vacas que no recibieron ningún agente neutralizante o que recibieron suplementos de bicarbonato sódico que en las que recibieron suplementos de óxido de magnesio. Los cambios en la ingesta se deben probablemente a las condiciones del rumen, ya que el pH del rumen disminuyó con la reducción progresiva del FCR dietético. La digestibilidad aparente de los FDN disminuyó a medida que disminuía el FCR dietético, y a un FCR dietético bajo, la digestibilidad aparente de los FDN del tracto total fue menor en las vacas no suplementadas o suplementadas con bicarbonato sódico que en las suplementadas con óxido de magnesio. Los cambios en la digestibilidad de la fibra pueden deberse en parte a modificaciones en la población microbiana del rumen. A pesar de que el NC teórico de una dieta es similar cuando se elimina el bicarbonato sódico y se sustituye por una mezcla de óxido de magnesio a un tercio de la dosis de bicarbonato sódico, el pH ruminal aumentó, especialmente cuando el FCR de la dieta era bajo. A la hora de evaluar los efectos potenciales del equilibrio catiónico-aniónico de la dieta sobre la ingesta de pienso al alimentar con óxido de magnesio y eliminar el bicarbonato sódico, es preferible calcular el equilibrio aniónico de la dieta teniendo en cuenta el Ca, el P y el Mg además del Na y el K.

### AGRADECIMIENTOS

Este estudio ha contado con el apoyo financiero de Timab Magnesium (Dinard, Francia). Los autores MB, JV y AC están asociados directa o indirectamente con la organización financiadora. Los autores AB y GE no han declarado ningún conflicto de intereses.

### BIBLIOGRAFÍA

- Aguerre, M. J., M. A. Wattiaux, J. M. Powell, G. A. Broderick, and C. Arndt. 2011. Effect of forage-to-concentrate ratio in dairy cow diets on emission of methane, carbon dioxide, and ammonia, lactation performance, and manure excretion. *J. Dairy Sci.* 94:3081–3093. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-4011>.
- Akbari, V., S. N. Anfinsen, A. P. Doulgeris, and T. Eltoft. 2013. The Hotelling–Lawley trace statistic for change detection in polarimetric SAR data under the complex Wishart distribution. Pages 4162–4165 in Proc. IEEE International Geoscience and Remote Sensing Symposium. IGARSS, Melbourne, Australia. <https://doi.org/10.1109/IGARSS.2013.6723750>.
- Argov-Argaman, N., R. Mesilati-Stahy, Y. Magen, and U. Moallem. 2014. Elevated concentrate-to-forage ratio in dairy cow rations is associated with a shift in the diameter of milk fat globules and remodeling of their membranes. *J. Dairy Sci.* 97:6286–6295. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8174>.
- Bach, A., I. Guasch, G. Elcoso, J. Duclos, and H. Khelil-Arfa. 2018. Modulation of rumen pH by sodium bicarbonate and a blend of different sources of magnesium oxide in lactating dairy cows submitted to a concentrate challenge. *J. Dairy Sci.* 101:9777–9788. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-14353>.
- Bach, A., A. López-García, O. González-Recio, G. Elcoso, F. Fàbregas, F. Chaucheyras-Durand, and M. Castex. 2019. Changes in the rumen and colon microbiota and effects of live yeast dietary supplementation during the transition from the dry period to lactation of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 102:6180–6198. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-16105>.
- Batajoo, K. K., and R. D. Shaver. 1994. Impact of nonfiber carbohydrate on intake, digestion, and milk production by dairy cows. *J. Dairy Sci.* 77:1580–1588. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(94\)77100-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(94)77100-9).
- Beede, D. 2017. Can we differentiate supplemental magnesium sources nutritionally? Pages 99–107 in Proc. Tri-State Dairy Nutrition Conference, Fort Wayne, IN.
- Benjamini, Y., and Y. Hochberg. 1995. Controlling the false discovery rate: A practical and powerful approach to multiple testing. *J. R. Stat. Soc. B* 57:289–300. <https://doi.org/10.1111/j.2517-6161.1995.tb02031.x>.
- Blanch, M., S. Calsamiglia, M. Devant, and A. Bach. 2010. Effects of acarbose on ruminal fermentation, blood metabolites and microbial profile involved in ruminal acidosis in lactating cows fed a high-carbohydrate ration. *J. Dairy Res.* 77:123–128. <https://doi.org/10.1017/S0022029909990562>.
- Bray, J. R., and J. T. Curtis. 1957. An ordination of the upland forest communities of southern Wisconsin. *Ecol. Monogr.* 27:325–349. <https://doi.org/10.2307/1942268>.
- Calsamiglia, S., P. W. Cardozo, A. Ferret, and A. Bach. 2008. Changes in rumen microbial fermentation are due to a combined effect of type of diet and pH. *J. Anim. Sci.* 86:702–711. <https://doi.org/10.2527/jas.2007-0146>.
- Cheng, K.-J., J. P. Fay, R. E. Howarth, and J. W. Costerton. 1980. Sequence of events in the digestion of fresh legume leaves by rumen bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 40:613–625. <https://doi.org/10.1128/aem.40.3.613-625.1980>.
- Constable, P. D., A. A. Megahed, and M. W. H. Hiew. 2019. Measurement of urine pH and net acid excretion and their association with urine calcium excretion in periparturient dairy cows. *J. Dairy Sci.* 102:11370–11383. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16805>.
- Danschler, A. M., S. Li, P. H. Andersen, E. Khafipour, N. B. Kristensen, and J. C. Plaizier. 2015. Indicators of induced subacute ruminal acidosis (SARA) in Danish Holstein cows. *Acta Vet. Scand.* 57:39. <https://doi.org/10.1186/s13028-015-0128-9>.
- Delgado, B., A. Bach, I. Guasch, C. González, G. Elcoso, J. E. Pryce, and O. González-Recio. 2019. Whole rumen metagenome sequencing allows classifying and predicting feed efficiency and intake levels in cattle. *Sci. Rep.* 9:11. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36673-w>.
- DeVries, T. J., K. A. Beauchemin, F. Dohme, and K. S. Schwartzkopf-Genswein. 2009. Repeated ruminal acidosis challenges in lactating dairy cows at high and low risk for developing acidosis: Feeding, ruminating, and lying behavior. *J. Dairy Sci.* 92:5067–5078. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2102>.
- Dias, A. L. G., J. A. Freitas, B. Micai, R. A. Azevedo, L. F. Greco, and J. E. P. Santos. 2018. Effect of supplemental yeast culture and dietary starch content on rumen fermentation and digestion in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 101:201–221. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13241>.
- Emery, R. S., and L. D. Brown. 1961. Effect of feeding sodium and potassium bicarbonate on milk fat, rumen pH, and volatile fatty

- acid production. *J. Dairy Sci.* 44:1899–1902. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(61\)89981-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(61)89981-5).
- Enemark, J. M. D., R. J. Jorgensen, and N. B. Kristensen. 2004. An evaluation of parameters for the detection of subclinical rumen acidosis in dairy herds. *Vet. Res. Commun.* 28:687–709. <https://doi.org/10.1023/B:VERC.0000045949.31499.20>.
- 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. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(80\)83027-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(80)83027-X).
- Erdman, R. A., R. W. Hemken, and L. S. Bull. 1982. Dietary sodium bicarbonate and magnesium oxide for early postpartum lactating dairy cows: Effects on production, acid base metabolism, and digestion. *J. Dairy Sci.* 65:712–731. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(82\)82259-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(82)82259-5).
- Escobosa, A., C. E. Coppock, L. D. Rowe Jr., W. L. Jenkins, and C. E. Gates. 1984. Effects of dietary sodium bicarbonate and calcium chloride on physiological responses of lactating dairy cows in hot weather. *J. Dairy Sci.* 67:574–584. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(84\)81341-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(84)81341-7).
- Fernando, S. C., H. T. Purvis II, F. Z. Najjar, 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. *Appl. Environ. Microbiol.* 76:7482–7490. <https://doi.org/10.1128/AEM.00388-10>.
- Friggens, N. C., B. L. Nielsen, I. Kyriazakis, B. J. Tolcamp, and G. C. Emmans. 1998. Effects of feed composition and stage of lactation on the short-term feeding behavior of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 81:3268–3277. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(98\)75891-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(98)75891-6).
- Gao, X., and M. Oba. 2016. Characteristics of dairy cows with a greater or lower risk of subacute ruminal acidosis: Volatile fatty acid absorption, rumen digestion, and expression of genes in rumen epithelial cells. *J. Dairy Sci.* 99:8733–8745. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11570>.
- Goff, J. P., R. Ruiz, and R. L. Horst. 1997. Relative acidogenic activity of commonly used anionic salts—Re-thinking the dietary cation-anion difference equations. *J. Dairy Sci.* 80(Suppl. 1):169.
- Gozho, G. N., J. C. Plaizier, D. O. Krause, A. D. Kennedy, and K. M. Wittenberg. 2005. Subacute ruminal acidosis induces ruminal lipopolysaccharide endotoxin release and triggers an inflammatory response. *J. Dairy Sci.* 88:1399–1403. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)72807-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)72807-1).
- Greter, A. M., T. J. DeVries, and M. A. G. von Keyserlingk. 2008. Nutrient intake and feeding behavior of growing dairy heifers: Effects of dietary dilution. *J. Dairy Sci.* 91:2786–2795. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1052>.
- Hoover, W. H. 1986. Chemical factors involved in ruminal fiber digestion. *J. Dairy Sci.* 69:2755–2766. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(86\)80724-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(86)80724-X).
- Hu, W., and M. R. Murphy. 2004. Dietary cation-anion difference effects on performance and acid-base status of lactating dairy cows: A meta-analysis. *J. Dairy Sci.* 87:2222–2229. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)70042-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)70042-9).
- Hu, W., M. R. Murphy, P. D. Constable, and E. Block. 2007. Dietary cation-anion difference effects on performance and acid-base status of dairy cows postpartum. *J. Dairy Sci.* 90:3367–3375. <https://doi.org/10.3168/jds.2006-515>.
- Humer, E., R. M. Petri, J. R. Aschenbach, B. J. Bradford, G. B. Penner, M. Tafaj, K.-H. Südekum, and Q. Zebeli. 2018. *Invited review*: Practical feeding management recommendations to mitigate the risk of subacute ruminal acidosis in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 101:872–888. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13191>.
- Ishaq, S.L., O. AlZahal, N. Walker, and B. McBride. 2017. An investigation into rumen fungal and protozoal diversity in three rumen fractions, during high-fiber or grain-induced sub-acute ruminal acidosis conditions, with or without active dry yeast supplementation. *Front Microbiol.* 8:1943. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01943>.
- Iwaniuk, M. E., and R. A. Erdman. 2015. Intake, milk production, ruminal, and feed efficiency responses to dietary cation-anion difference by lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 98:8973–8985. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9949>.
- Jackson, J. A., V. Akay, S. T. Franklin, and D. K. Aaron. 2001. The effect of cation-anion difference on calcium requirement, feed intake, body weight gain, and blood gases and mineral concentrations of dairy calves. *J. Dairy Sci.* 84:147–153. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(01\)74463-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(01)74463-3).
- Kargar, S., M. Khorvash, G. R. Ghorbani, M. Alikhani, and W. Z. Yang. 2010. *Short communication*: Effects of dietary fat supplements and forage:concentrate ratio on feed intake, feeding, and chewing behavior of Holstein dairy cows. *J. Dairy Sci.* 93:4297–4301. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3168>.
- Kilmer, L. H., L. D. Muller, and T. J. Snyder. 1981. Addition of sodium bicarbonate to rations of postpartum dairy cows: Physiological and metabolic effects. *J. Dairy Sci.* 64:2357–2369. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(81\)82858-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(81)82858-5).
- Leonhard-Marek, S., F. Stumpff, and H. Martens. 2010. Transport of cations and anions across forestomach epithelia: Conclusions from *in vitro* studies. *Animal* 4:1037–1056. <https://doi.org/10.1017/S1751731110000261>.
- Levy, G. B. 1981. Determination of sodium with ion-selective electrodes. *Clin. Chem.* 27:1435–1438. <https://doi.org/10.1093/clinchem/27.8.1435>.
- Li, F., Z. Wang, C. Dong, F. Li, W. Wang, Z. Yuan, F. Mo, and X. Weng. 2017. Rumen bacteria communities and performances of fattening lambs with a lower or greater subacute ruminal acidosis risk. *Front. Microbiol.* 8:2506. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02506>.
- Li, S., G. N. Gozho, N. Gakhar, E. Khafipour, D. O. Krause, and J. C. Plaizier. 2012. Evaluation of diagnostic measures for subacute ruminal acidosis in dairy cows. *Can. J. Anim. Sci.* 92:353–364. <https://doi.org/10.4141/cjas2012-004>.
- Machado, S. C., C. M. McManus, M. T. Stumpf, and V. Fischer. 2014. Concentrate:forage ratio in the diet of dairy cows does not alter milk physical attributes. *Trop. Anim. Health Prod.* 46:855–859. <https://doi.org/10.1007/s11250-014-0576-7>.
- Macleod, G. K., D. G. Grieve, and I. McMillan. 1983. Performance of first lactation dairy cows fed complete rations of several ratios of forage to concentrate. *J. Dairy Sci.* 66:1668–1674. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(83\)81990-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(83)81990-0).
- Mao, S. Y., R. Y. Zhang, D. S. Wang, and W. Y. Zhu. 2013. Impact of subacute ruminal acidosis (SARA) adaptation on rumen microbiota in dairy cattle using pyrosequencing. *Anaerobe* 24:12–19. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2013.08.003>.
- Martins, C. M. R., D. C. M. Fonseca, B. G. Alves, F. P. Rennó, and M. V. Santos. 2021. Effect of dietary non-fiber carbohydrate source and inclusion of buffering on lactation performance, feeding behavior and milk stability of dairy cows. *Anim. Feed Sci. Technol.* 278:115000. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2021.115000>.
- McGovern, E., M. McGee, C. J. Byrne, D. A. Kenny, A. K. Kelly, and S. M. Waters. 2020. Investigation into the effect of divergent feed efficiency phenotype on the bovine rumen microbiota across diet and breed. *Sci. Rep.* 10:15317. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71458-0>.
- McMurdie, P. J., and S. Holmes. 2013. phyloseq: An R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS One* 8:e61217. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>.
- Michaylova, V., and P. Ilkova. 1971. Photometric determination of micro amounts of calcium with arsenazo III. *Anal. Chim. Acta* 53:194–198. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(01\)80088-X](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(01)80088-X).
- Mould, F. L., E. R. Ørskov, and S. O. Mann. 1983. Associative effects of mixed feeds. I. Effect of type and level of supplementation and the influence of the rumen fluid pH on cellulolysis *in vivo* and dry matter digestion on various roughages. *Anim. Feed Sci. Technol.* 10:15–30. [https://doi.org/10.1016/0377-8401\(83\)90003-2](https://doi.org/10.1016/0377-8401(83)90003-2).
- National Research Council (NRC). 1989. *Nutrient Requirements of Dairy Cattle*. 6th rev. ed. Natl. Acad. Sci.
- Oba, M., and M. S. Allen. 2003. Effects of corn grain conservation method on feeding behavior and productivity of lactating dairy

- cows at two dietary starch concentrations. *J. Dairy Sci.* 86:174–183. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73598-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73598-X).
- Offner, A., A. Bach, and D. Sauvant. 2003. Quantitative review of in situ starch degradation in the rumen. *Anim. Feed Sci. Technol.* 106:81–93. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(03\)00038-5](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(03)00038-5).
- Olijhoek, D. W., P. Løvendahl, J. Lassen, A. L. F. Hellwing, J. K. Höglund, M. R. Weisbjerg, S. J. Noel, F. McLean, O. Højberg, and P. Lund. 2018. Methane production, rumen fermentation, and diet digestibility of Holstein and Jersey dairy cows being divergent in residual feed intake and fed at 2 forage-to-concentrate ratios. *J. Dairy Sci.* 101:9926–9940. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-14278>.
- Oliveira, J. P. P., A. F. Bicalho, V. M. R. Malacco, C. F. A. Lage, H. M. Saturnino, S. G. Coelho, B. M. Sousa, J. P. P. Rodrigues, and R. B. Reis. 2020. Supplementation with different non-fiber carbohydrate sources in dairy cow diets with high or low rumen-undegradable protein content. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 72:936–946. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-10820>.
- Patra, R. C., S. B. Lal, and D. Swarup. 1993. Physicochemical alterations in blood, cerebrospinal fluid and urine in experimental lactic acidosis in sheep. *Res. Vet. Sci.* 54:217–220. [https://doi.org/10.1016/0034-5288\(93\)90060-S](https://doi.org/10.1016/0034-5288(93)90060-S).
- Petri, R. M., T. Schwaiger, G. B. Penner, K. A. Beauchemin, R. J. Forster, J. J. McKinnon, and T. A. McAllister. 2013. Characterization of the core rumen microbiome in cattle during transition from forage to concentrate as well as during and after an acidotic challenge. *PLoS One* 8:e83424. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083424>.
- Plaizier, J. C., D. O. Krause, G. N. Gozho, and B. W. McBride. 2008. Subacute ruminal acidosis in dairy cows: The physiological causes, incidence and consequences. *Vet. J.* 176:21–31. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.12.016>.
- R Core Team. 2022. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Accessed Feb. 14, 2022. <https://www.R-project.org/>.
- Ramos, S. C., C.-D. Jeong, L. L. Mamuad, S.-H. Kim, A.-R. Son, M. A. Miguel, M. Islam, Y.-I. Cho, and S.-S. Lee. 2021. Enhanced ruminal fermentation parameters and altered rumen bacterial community composition by formulated rumen buffer agents fed to dairy cows with a high-concentrate diet. *Agriculture* 11:554. <https://doi.org/10.3390/agriculture11060554>.
- Ritchie, M. E., B. Phipson, D. Wu, Y. Hu, C. W. Law, W. Shi, and G. K. Smyth. 2015. Limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res.* 43:e47. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv007>.
- Rogers, J. A., L. D. Muller, C. L. Davis, W. Chalupa, D. S. Kronfeld, L. F. Karcher, and K. R. Cummings. 1985. Response of dairy cows to sodium bicarbonate and limestone in early lactation. *J. Dairy Sci.* 68:646–660. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(85\)80871-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(85)80871-7).
- Russell, J. B., and D. B. Dombrowski. 1980. Effect of pH on the efficiency of growth by pure cultures of rumen bacteria in continuous culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 39:604–610. <https://doi.org/10.1128/aem.39.3.604-610.1980>.
- Sanchez, W. K., and D. K. Beede. 1996. Is there an optimal cation-anion difference for lactation diets? *Anim. Feed Sci. Technol.* 59:3–12. [https://doi.org/10.1016/0377-8401\(95\)00882-9](https://doi.org/10.1016/0377-8401(95)00882-9).
- Seaton, B., and A. Ali. 1984. Simplified manual high performance clinical chemistry methods for developing countries. *Med. Lab. Sci.* 41:327–336.
- Staples, C. R., S. M. Emanuele, M. Ventura, D. K. Beede, and B. Schrick. 1988. Effects of a new multielement buffer on production, ruminal environment and blood minerals of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 71:1573–1586. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(88\)79721-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(88)79721-0).
- Stefanska, B., W. Człapa, E. Pruszyńska-Oszmałek, D. Szczepankiewicz, V. Fievez, J. Komisarek, K. Stajek, and W. Nowak. 2018. Subacute ruminal acidosis affects fermentation and endotoxin concentration in the rumen and relative expression of the CD14/TLR4/MD2 genes involved in lipopolysaccharide systemic immune response in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 101:1297–1310. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-12896>.
- Stokes, M. R., L. L. Vandemark, and L. S. Bull. 1986. Effects of sodium bicarbonate, magnesium oxide, and a commercial buffer mixture in early lactation cows fed hay crop silage. *J. Dairy Sci.* 69:1595–1603. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(86\)80576-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(86)80576-8).
- Takagi, H., and E. Block. 1988. Effect of manipulating dietary cation-anion balance on calcium kinetics in normocalcemic and EGTa-infused sheep. *J. Dairy Sci.* 71(Suppl. 1):153 (Abstr.).
- Tamames, J., and F. Puente-Sánchez. 2019. SqueezeMeta, a highly portable, fully automatic metagenomic analysis pipeline. *Front. Microbiol.* 9:3349. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03349>.
- Tebbe, A. W., D. J. Wyatt, and W. P. Weiss. 2018. Effects of magnesium source and monensin on nutrient digestibility and mineral balance in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 101:1152–1163. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13782>.
- Teh, T. H., R. W. Hemken, and R. J. Harmon. 1985. Dietary magnesium oxide interactions with sodium bicarbonate on cows in early lactation. *J. Dairy Sci.* 68:881–890. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(85\)80905-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(85)80905-X).
- Thomas, J. W., R. S. Emery, J. K. Breux, and J. S. Liesman. 1984. Response of milking cows fed a high concentrate, low roughage diet plus sodium bicarbonate, magnesium oxide, or magnesium hydroxide. *J. Dairy Sci.* 67:2532–2545. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(84\)81610-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(84)81610-0).
- Throne, M., A. Bach, M. Ruiz-Moreno, M. D. Stern, and J. G. Linn. 2009. Effects of *Saccharomyces cerevisiae* on ruminal pH and microbial fermentation in dairy cows: Yeast supplementation on rumen fermentation. *Livest. Sci.* 124:261–265. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2009.02.007>.
- Tucker, W. B., J. F. Hogue, M. Aslam, M. Lema, P. Le Ruyet, I. S. Shin, M. T. Van Koeveering, R. K. Vernon, and G. D. Adams. 1993. Controlled ruminal infusion of sodium bicarbonate. 3. Influence of infusion dose on systemic acid-base status, minerals, and ruminal milieu. *J. Dairy Sci.* 76:2222–2234. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(93\)77559-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(93)77559-1).
- Van Keulen, J., and B. A. Young. 1977. Evaluation of acid-insoluble ash as a natural marker in ruminant digestibility studies. *J. Anim. Sci.* 44:282–287. <https://doi.org/10.2527/jas1977.442282x>.
- Yang, W. Z., K. A. Beauchemin, and L. M. Rode. 2001. Effects of grain processing, forage to concentrate ratio, and forage particle size on rumen pH and digestion by dairy cows. *J. Dairy Sci.* 84:2203–2216. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(01\)74667-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(01)74667-X).
- Zebeli, Q., S. M. Dunn, and B. N. Ametaj. 2010. Strong associations among rumen endotoxin and acute phase proteins with plasma minerals in lactating cows fed graded amounts of concentrate. *J. Anim. Sci.* 88:1545–1553. <https://doi.org/10.2527/jas.2009-2203>.

## ORCID

Alex Bach  <https://orcid.org/0000-0001-6804-2002>