

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE AGRONOMÍA**

**EMISIÓN DE METANO ENTÉRICO DE VACAS LECHERAS EN
PASTOREO DE PRADERAS DOMINADAS POR GRAMÍNEAS O
POR LEGUMINOSAS**

por

Yoana DINI VILAR

TESIS presentada como uno de los
requisitos para obtener el título de
Magister en Ciencias Agrarias
opción Ciencias Animales

MONTEVIDEO
URUGUAY
julio 2012

Tesis aprobada por el tribunal integrado por Ing. Agr. Ana Espasandín, Ing. Agr. (PhD). Alejandro La Manna, Dr. Roberto Gratton, y Dr. César Pinares-Patiño, el 9 de julio de 2012. Autor. Ing. Agr. Yoana Dini Vilar. Directora Dra. Laura Astigarraga.

AGRADECIMIENTOS

- Al Equipo de Físico Química Ambiental de la Facultad de Ciencias Exactas (Tandil, Argentina), y en especial al Dr. Roberto Gratton, por los invaluable aportes realizados a lo largo de todo este trabajo y por su disposición continua a colaborar. A la Dra. Karen Williams por sus aportes, su amistad y hospitalidad. Y en forma muy especial al Dr. José Ignacio Gere, ya que sin sus aportes, disposición y colaboración continua no hubiera sido posible la realización de este trabajo.
- A Juan Mieres, Alejandro La Manna, Lucia Piaggio, María Methol y Pilar Irisarri, quienes fueron miembros de los tribunales de los seminarios, por su tiempo y sus invaluable aportes que permitieron mejorar el trabajo.
- Al Dr. Cesar Pinares-Patiño por sus importantes correcciones y aportes al trabajo escrito.
- Al Dr. Martin Manetti, por su colaboración en la etapa de lecturas cromatográficas.
- A Cristina Cabrera y Amabelia del Pino por facilitar sus laboratorios para el procesamiento de muestras.
- A Carolina Briano, Pablo Rovira y Dana Montedónico por su colaboración en la etapa de laboratorio y de campo.
- A Carlos Batista y Eduardo Llanos por su colaboración en la colocación de las cápsulas de SF₆ en los animales.
- A mis compañeros de la Maestría: Pablo Modernel, María Laura Caorsi, Gonzalo Becoña, por el apoyo, preocupación y los aportes realizados.
- A Cecilia Carballo, Ana Laura Sánchez, Washington Bell e Inés Arrieta, por escucharme, aconsejarme y acompañarme siempre que lo necesité.
- A Magela Santoro y Manuel Moura por su colaboración en el trabajo de campo y por estar siempre en forma incondicional y su amistad.
- A Laura Astigarraga, por guiarme y formarme constantemente a lo largo de este proceso.
- A mi familia, porque son quienes me apoyan siempre incondicionalmente y que sin su apoyo sería imposible concretar estos logros.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
RESUMEN.....	VI
SUMMARY.....	VII
1. <u>INTRODUCCIÓN</u>	1
1.1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
1.1.1. <u>Importancia del CH₄ como GEI</u>	3
1.1.2. <u>Emisiones de GEIs en Uruguay</u>	4
1.1.3. <u>Producción, emisión y rendimiento de metano por rumiantes</u>	5
1.1.4. <u>Efecto de las características del forraje sobre la emisión de CH₄ entérico</u>	7
1.2. METODOLOGÍA PARA LA ESTIMACIÓN DE CH₄ ENTÉRICO EN ANIMALES EN PASTOREO	15
1.2.1. <u>Fundamentación</u>	15
1.2.2. <u>Cápsula emisora de SF₆</u>	17
1.2.3. <u>Adaptación de la técnica de SF₆ para mediciones en tiempo prolongado</u>	18
1.3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	20
1.3.1. <u>Hipótesis</u>	20
1.3.2. <u>Objetivo general</u>	21
1.3.3. <u>Objetivos específicos</u>	21
2. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	22
2.1. PUESTA A PUNTO DE LA TÉCNICA DE TRAZADO POR SF₆ PARA MEDICIONES EN TIEMPO PROLONGADO	22
2.1.1. <u>Homologación de recipientes recolectores</u>	22
2.1.2. <u>Homologación de restrictores de flujo</u>	23
2.1.3. <u>Cápsulas emisoras de SF₆</u>	24

2.1.4. <u>Bozales</u>	25
2.2. ESTIMACIÓN DE LAS EMISIONES DE METANO EN PASTOREO	25
2.2.1. <u>Mediciones en las pasturas</u>	26
2.2.2. <u>Mediciones en los animales experimentales</u>	28
2.2.2.1. Medición de la emisión de CH ₄	29
2.3. ANÁLISIS QUÍMICOS	29
2.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	31
3. <u>RESULTADOS</u>	33
3.1. CARACTERÍSTICAS DE LAS PASTURAS OFRECIDAS Y DEL FORRAJE DEFOLIADO	33
3.2. CONSUMO DE FORRAJE	36
3.3. PRODUCCIÓN y COMPOSICIÓN DE LECHE Y CAMBIO DEL PESO VIVO	36
3.4. EMISIÓN DE METANO EN VACAS LECHERAS EN PASTOREO	37
4. <u>DISCUSIÓN</u>	39
4.1. CALIDAD DEL FORRAJE OFRECIDO	39
4.2. CONSUMO Y CALIDAD DEL FORRAJE DEFOLIADO (DIETA)	40
4.3. EMISIÓN DE METANO	41
5. <u>CONCLUSIONES</u>	44
6. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	45
7. <u>ANEXOS</u>	56
7.1. ANEXO 1	56
7.2. ANEXO 2	72

RESUMEN

En Uruguay el metano (CH₄) representa el 80% de las emisiones de Gases de Efecto Invernadero (GEIs) y proviene principalmente de la fermentación entérica. Los sistemas de producción lechera en el país se desarrollan con una alimentación básicamente pastoril, y han sido cuestionados por emitir mayores niveles de CH₄ que aquellos que incorporan concentrados. Por otro lado, existen diferencias en la emisión de CH₄ en rumiantes, según pastoreen gramíneas o leguminosas. El objetivo de este estudio fue estimar las emisiones de CH₄ de vacas lecheras en pastoreo, en dos pasturas contrastantes: L, donde *Medicago sativa* y *Trifolium repens* representaban el 60% de la Materia Seca (MS) y G, donde *Lolium multiflorum* representaba el 76% MS. Se pastoreó en franjas diarias con una asignación prevista de 30 kg MS/vaca. Se utilizó un diseño de cuadrado latino 2*2, con 8 vacas Holando en lactación y 2 periodos de medición de 21 días. Se midió producción de leche y la emisión de CH₄ entérico mediante la técnica de trazado por SF₆, adaptada para recoger muestras durante 5 días. El consumo de materia orgánica (MOI) se estimó por dilución de óxido de cromo (Cr₂O₃) y la digestibilidad del forraje (DMO) por el método de indicadores fecales (nitrógeno (N), fibra detergente ácida (FDA)). La composición química inicial difirió entre pasturas: G presentó mayor contenido de MS (108 g/kg; P<0,001), Fibra detergente neutro (aFDN_{mo}=71 g/kg; P<0,05) y Fibra detergente ácido (FDAmo=47 g/kg; P<0,10). La biomasa ofrecida (2165 kg MS/ha), la altura (29,5 cm), la profundidad de defoliación (9,5 cm) y la utilización del forraje (42%) no difirieron entre pasturas. Esto permitió realizar un pastoreo selectivo, siendo la calidad del forraje defoliado superior a la del ofrecido, sin evidenciarse diferencias en la composición química del defoliado, ni en DMO (70,7%), ni en MOI (15,7 kg MO), así como tampoco en producción de leche (20,3 kg/d) ni en emisiones de CH₄ (368 g/d). En conclusión, debido a la alta asignación de forraje, ni la calidad de las dietas seleccionadas por las vacas en pastoreo ni el consumo voluntario difirió entre las pasturas (L vs. G). Esto indica que las propiedades de la dieta (asociado a digestibilidad y consumo) tienen mayor importancia que las propiedades inherentes de gramíneas y leguminosas en relación a las emisiones de CH₄.

Palabras clave: vacas lecheras, CH₄, SF₆, pastoreo, consumo

SUMMARY

ENTERIC METHANE EMISSIONS FROM DAIRY COWS AT GRASSLAND PASTURES DOMINATED BY GRASSES OR LEGUMES

In Uruguay, methane (CH₄) represents 80% of the emissions of greenhouse gases (GHGs) and comes mainly from enteric fermentation. Dairy production systems in the country are based on grazing, and have been questioned for higher CH₄ emissions than those based on feedstuff. On the other hand, there are differences in the emission of CH₄ from ruminants grazing grasses or legumes. The aim of this study was to estimate emissions of CH₄ from dairy cows grazing at two contrasting pastures: L, where *Medicago sativa* and *Trifolium repens* accounted for 60% of dry matter (DM) and G, where *Lolium multiflorum* accounted for 76% of DM. They were grazed in daily strips with provided an allocation of 30 kg DM/cow. A 2×2 Latin square design was used, with 8 lactating Holstein dairy cows and two measurement periods of 21 days. Milk production was measured and enteric CH₄ emission using the SF₆ tracer technique adapted for extended sample collection across 5 days. Organic matter intake (OMI) was estimated using chromium oxide (Cr₂O₃) and forage digestibility (OMD) was estimated by the fecal indicators method (nitrogen (N) and acid detergent fibre (ADF)). The initial chemical composition differed between pastures: G had higher DM content (108 g/kg, P<0.001), neutral detergent fiber (aNDFom= 71 g/kg, P<0.05) and acid detergent fiber (ADFom=47 g/kg, P<0.10). Mass of herbage offered (2165 kg DM/ha), height (29.5 cm), depth of defoliation (9.5 cm) and forage utilization (42%) did not differ between pastures. This allowed selective grazing, forage quality being defoliated higher than the offer, without differences in the chemical composition of defoliated, or OMD (70.7%), or OMI (15.7 kg OM), nor in milk production (20.3 kg/d) or CH₄ emissions (368 g/d). In conclusion, due to high herbage allowances, neither the quality of the diets selected by the grazing cows nor the voluntary feed intake differed between pastures (L vs. G). This finding indicates that diet properties (associated to feed digestibility and intake) overrides the inherent properties of grasses and legumes in regards to CH₄ emission.

Keywords: dairy cows, CH₄, SF₆, grazing, intake

1. INTRODUCCIÓN

El Cambio Climático fue declarado en la Cumbre de la Tierra de Rio de Janeiro (1992), como uno de los tres grandes problemas ambientales de naturaleza global, junto a la pérdida de biodiversidad y al adelgazamiento de la capa de ozono estratosférico (ONU, 1992). En dicha Cumbre se firmó la Convención Marco de las Naciones Unidas sobre el Cambio Climático (CMNUCC), teniendo como principal objetivo la estabilización de las concentraciones de gases de efecto invernadero (GEIs) en la atmósfera (ONU, 1992). Para ello, los países industrializados, incluidos en el Anexo I del Protocolo de Kioto (ONU, 1998) se comprometieron a reducir sus emisiones de gases de efecto invernadero en al menos el 5% (a nivel global) entre 2008-2012, respecto a los niveles de 1990. Los países que han ratificado el Protocolo de Kioto (pero que no están incluidos en el Anexo I), entre los que se encuentra Uruguay (desde 1998), proporcionan inventarios periódicos de los GEIs a la Organización de las Naciones Unidas (ONU), pero hasta ahora no están obligados a reducir sus emisiones.

En Uruguay, la Dirección Nacional de Medio Ambiente (DINAMA) tiene el cometido de elaborar el Inventario Nacional de GEIs, el que se divide en cinco sectores (1-Energía; 2-Procesos Industriales y uso de Disolventes; 3-Agricultura; 4-Uso de la Tierra, Cambios en el Uso de la Tierra y Forestación y 5-Desechos). De acuerdo al último Inventario Nacional de GEIs del 2004 (DINAMA, 2010), el sector agricultura contribuyó de manera importante (80%) al total de emisiones de GEI, expresadas en unidades de dióxido de carbono equivalente (CO₂ eq), principalmente con aportes de metano (CH₄) y óxido nitroso (N₂O). En lo referente al total de emisiones de CH₄ del país, el sector Agricultura representa el 93% del total de dichas emisiones, siendo la fermentación entérica la principal fuente de CH₄ (86,8% del total nacional) con un alto porcentaje atribuido a la fermentación entérica de ganado vacuno (80,4%) (DINAMA, 2010). Estas emisiones cobran relevancia en lo que respecta al efecto invernadero, dado que el CH₄ tiene un potencial de calentamiento global a 100 años, 25 veces superior al del CO₂ (IPCC, 2001). Hasta el presente, las

emisiones nacionales han sido calculadas utilizando factores de emisión extraídos del Panel Intergubernamental de Cambio Climático (IPCC) (1996, 2007) elaborados a partir de valores reportados en la bibliografía internacional. El empleo de estos factores de emisión que no han sido corroborados en las condiciones de los sistemas de producción del país, podría estar afectando la calidad de los resultados reportados en los inventarios, por lo que resulta necesario aplicar métodos de cálculo con mayor precisión, utilizando factores de emisión específicos como buena práctica para reducir incertidumbres (IPCC, 2007).

Los sistemas de producción pastoriles han sido particularmente cuestionados por emitir más CH_4 entérico por unidad de producto que los sistemas mixtos o aquellos basados en el alto uso de concentrados. En este sentido, para países agroexportadores como Uruguay, donde los sistemas de producción de leche son en su mayoría de base pastoril, se debe enfrentar el reto de incrementar la productividad animal (ej. carne y leche) para satisfacer la demanda creciente de alimentos (FAO, 2011) y al mismo tiempo reducir las emisiones de CH_4 por unidad de producto animal (ej. $\text{kg CH}_4/\text{L}$ leche o $\text{kg CH}_4/\text{kg}$ carne) (Makkar y Vercoe, 2007). A su vez, existe una necesidad para los países que han ratificado el Protocolo de Kioto (1997) de implementar metodologías para determinar las emisiones de GEIs que sean precisas, que tengan potencialidad de uso en el largo plazo y que sean comparables para la toma de decisiones políticas a nivel nacional e internacional (IPCC, 1996).

La mayoría de las medidas de producción de CH_4 a nivel mundial se han realizado en cámaras atmosféricas (Vermorel 1995, Blaxter y Clapperton 1965) pero para países como Uruguay, el principal requerimiento es poder realizar las mediciones de CH_4 de origen entérico en condiciones de pastoreo. Es por ello que este trabajo se planteó la necesidad de comenzar a obtener valores de emisión nacionales que permitan en un futuro, elaborar factores de emisión que reflejen las principales condiciones productivas del país. El presente estudio, utiliza la técnica que utiliza el hexafluoruro de azufre (SF_6) como trazador de la producción entérica de CH_4 , la cual permite la

estimación de las emisiones de CH₄ de animales individuales en pastoreo (Lassey *et al.* 1997, Johnson *et al.* 1994) y es la que se utilizará en el presente trabajo.

1.1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1.1. Importancia del CH₄ como GEI

El calentamiento global está asociado al incremento de las emisiones de gases de efecto invernadero (GEI) hacia la atmósfera. Los principales GEIs que se emiten a causa de las actividades antropogénicas son, CO₂, CH₄ y N₂O. Estas emisiones cobran relevancia en lo que respecta al “efecto invernadero” ya que, el CH₄ tiene un poder de calentamiento 25 veces mayor al CO₂ (IPCC, 2007), es decir, que cada kg de CH₄ liberado a la atmósfera contribuye al calentamiento global relativo tanto como la emisión de 25 kg de CO₂, calculado para un horizonte temporal de 100 años (Cambra-López *et al.*, 2008). Si bien, el vapor de agua es el principal GEI, su concentración en la atmósfera es muy variable y difícil de monitorear (Blas *et al.*, 2008).

La concentración de CO₂ en la atmósfera ha aumentado de manera significativa desde la Revolución Industrial provocando el actual “calentamiento de la Tierra”. A partir del año 1950 se dispararon las emisiones debidas al uso de combustibles fósiles, tanto las de petróleo como las de carbón y gas natural. En el mismo sentido, la concentración de CH₄ en la atmósfera también se ha incrementado a lo largo de los años, pasando de 580-730 partes por billón (ppb, volumen/volumen), en tiempos preindustriales a 1774 ppb, en la actualidad (Lelieveld, 1998). Según Primavesi *et al.* (2004), aproximadamente el 70% de las emisiones de CH₄ están relacionadas con las actividades humanas y los rumiantes son responsables del 25% de dichas emisiones (Makkar y Vercoe, 2007).

El aumento de la concentración de los GEIs en la atmósfera está incrementando la temperatura en la Tierra y las estimaciones realizadas a través de modelos indican, para algunos escenarios de emisiones futuras, que antes de fin de siglo el aumento será del orden de 2 a 6 °C (Forster *et al.* 2007, IPCC 2007). Las observaciones

directas de cambio recientes, a escala global y regional son el aumento de las temperaturas medias en el aire y en los océanos, el derretimiento de nieve y hielos, y el aumento del nivel medio del mar.

1.1.2. Emisiones de GEIs en Uruguay

Uruguay es un país que presenta una participación en las emisiones de GEI per cápita mayor al promedio mundial pero sensiblemente menor a la de los países industrializados. Este indicador es según el último Inventario de Emisiones de GEI realizado por Uruguay de aproximadamente 8 ton CO₂ eq (situación para el año 2004) (DINAMA 2010).

A diferencia del perfil mundial de emisiones, donde el CO₂ representa el 73% de las emisiones totales (UNICEN, 2006), Uruguay presenta como particularidad que el 80% de las emisiones de GEI provienen de la producción agropecuaria, y en particular de la ganadería. Las emisiones de CH₄ en Uruguay se originan fundamentalmente en el tracto digestivo de los rumiantes como producto final de la fermentación de los alimentos. De acuerdo al alto número de vacunos en relación al bajo número de habitantes es que Uruguay presenta un nivel de emisiones per cápita alto. Sin embargo, este indicador no debe ser tomado como representativo de la situación actual del país frente a la emisión global de GEIs a la atmósfera ya que, el país contribuye solo al 0,2% de las emisiones globales de este GEI (UNICEN, 2006).

Si bien, Uruguay no forma parte del Anexo I del Protocolo de Kioto (por lo que aún no existe un compromiso de disminuir sus emisiones) ni sus niveles de emisión de GEIs a la atmósfera son significativos respecto a los niveles globales, se debe tener en cuenta que existe a nivel mundial un nuevo escenario que incorpora el concepto de Huella de Carbono del producto como información adicional para los consumidores. La Huella de Carbono es la suma de todas las emisiones (directas e indirectas) de GEIs (expresada en CO₂ eq) que están asociados a la producción de un determinado bien, en este caso, de los productos como la carne y la leche (Krishnan, 2008). Esto implica que si en un futuro se utiliza este valor como una barrera para-

arancelaria, el país no solo deberá competir a nivel mundial en base a costos de producción sino que se introducirán nuevos criterios como la competitividad “ambiental”, donde se deberá incluir información sobre la huella de carbono por unidad de producto exportado. Por este motivo resulta de interés que se comiencen a obtener datos nacionales sobre emisión de GEIs, ya que hasta el momento Uruguay elabora sus Inventarios utilizando Factores de Emisión (Tier 1 y 2, reportados por el IPCC) (DINAMA, 2010) lo que podría estar afectando no solo la confiabilidad de los Inventarios sino también la Huella de Carbono de los productos exportados.

1.1.3. Producción, emisión y rendimiento de metano por rumiantes

El alimento que ingresa al aparato digestivo de los rumiantes no está directamente disponible para ser utilizado por el animal. Este sufre primero una acción mecánica producida por la masticación, que permite reducir el tamaño de la partícula, pero no es suficiente para permitir la absorción de los nutrientes. Luego, el alimento sufre una transformación adicional en el rumen por acción de la rumia y por la acción de los microorganismos ruminales (Church, 1990), los cuales fermentan una parte de los componentes del alimento ingerido por el animal (ej. celulosa, hemicelulosa, almidón y pectinas) (Blas *et al.* 2008, Martin *et al.* 2008). De esta fermentación los microorganismos obtienen la energía necesaria para sus funciones vitales y el animal accede a una parte del alimento (ej. ácidos grasos volátiles, AGV) que de otra forma le resultaría indigestible.

Los microorganismos ruminales tienen enzimas capaces de actuar sobre los carbohidratos de reserva (almidón) así como también sobre los carbohidratos estructurales (celulosa, hemicelulosa y pectinas) que componen las paredes celulares. Luego la flora microbiana fermenta los azúcares liberados dando lugar a la formación de ácidos grasos volátiles (AGV) (acetato, propionato y butirato), CO₂, CH₄ y calor (McDonald *et al.*, 1995), así como al crecimiento y proliferación de los propios microorganismos (Blas *et al.*, 2008). La relación de AGV producidos, es un aspecto a considerar ya que regula la producción de hidrogeniones (H₂) y por ende la

producción de CH₄ (Johnson y Johnson, 1995). De esta forma, por cada molécula de glucosa (que tiene 6 C) se puede generar 2 acetatos o 2 propionatos o 1 butirato (Church, 1990). Esto implica que en la formación de acetato y butirato se liberan H₂ que promueven la producción de CH₄, mientras que la formación de propionato implica captura de H₂, por lo que puede ser considerada como una forma competitiva en el uso del H₂ (Vlaming 2008, Moss *et al.* 2000).

Entonces, el CH₄ es uno de los productos finales de la fermentación microbiana de los hidratos de carbono del alimento y es formado por Arqueobacterias (Martin *et al.* 2008, Vlaming 2008) quienes poseen la capacidad de reducir el CO₂ usando H₂ como única fuente de energía, con la formación de CH₄ y H₂O (Clark *et al.* 2011, Vlaming 2008). Las Arqueobacterias son anaerobias estrictas, y muy sensibles a cambios en el medio ruminal, especialmente pH, siendo su rango óptimo de 6,5 a 7,0 (similar al de las bacterias celulolíticas) (Blas *et al.*, 2008). Ambos tipos de microorganismos están asociadas a la producción de acetato, donde se libera CO₂, necesario para la formación de CH₄, por lo que existe una relación directa entre la formación de acetato y CH₄ (Martin *et al.*, 2008).

El CH₄ no puede ser utilizado por el animal y es eliminado en mayor proporción por eructos o por exhalación junto con otros gases producidos en el rumen. La formación de CH₄ representa para el animal una pérdida de entre el 2 al 12% de la energía bruta ingerida en los alimentos (Vlaming 2008, López y Newbold 2007, Pinares-Patiño *et al.* 2003b, Johnson y Johnson 1995) o del 8 al 14% de la energía digestible ingerida en los alimentos (Cottle *et al.*, 2011), resultando en fuente de emisión de GEIs hacia la atmósfera (Vlaming 2008, Makkar y Vercoe 2007). En cambio, la metanogénesis y la eliminación de los gases son un componente esencial en el rumen (Clark *et al.*, 2011) ya que, permite mantener el pH ruminal en condiciones estables para la actividad microbiana (Martin *et al.*, 2010). Entonces, la importancia de la metanogénesis radica en que, la formación de CH₄ es la principal vía para la remoción del H₂ generado durante la producción de ATP por los microorganismos anaeróbicos del rumen (Martin *et al.*, 2008). Por ello, cualquier intento de modificar

la producción de CH₄ ruminal debe tener en cuenta la forma alternativa de remoción del H₂, de manera que no se vea perjudicada la eficiencia del sistema digestivo (Clark *et al.*, 2011).

Las pérdidas de CH₄ en términos de energía, se expresan normalmente como fracción de la Energía Bruta ingerida (EBI), este término es conocido como methane yield (Y_m) (Lassey, 2007). Como se indica en las guías del IPCC (2007, 1996), el valor de Y_m depende de la calidad y la digestibilidad de las distintas dietas. Los valores de Y_m que se encuentran en la bibliografía varían, como ya se mencionó, entre el 2% y el 12% de la energía ingerida para distintas dietas (Johnson y Johnson 1995), si bien los valores extremos corresponden a situaciones no usuales en la práctica. En cambio, el IPCC (2007) propone valores de Y_m entre el 2% (feedlot con 90% de la dieta a base de concentrados) y el 7,5% (vacunos en diferentes sistemas de producción pastoril). En este sentido, el valor de Y_m reportado por el IPCC para animales en pastoreo de 6,5% corresponde a 19,8 g CH₄/kg MS consumida, considerando, como regla general, que muchos alimentos contienen alrededor de 18,4 MJ de EB/kg MS y el CH₄ contiene 55,65 MJ/kg, lo que da el valor típico de Y_m mencionado (Lassey, 2007).

1.1.4. Efecto de las características del forraje sobre la emisión de CH₄ entérico

Si bien es sabido que las dietas en base a forrajes presentan mayor Y_m que dietas en base a concentrados (Harper *et al.*, 1999), existen también diferencias de pérdidas de energía bruta ingerida como CH₄ en función del tipo de forraje (Ramírez-Restrepo y Barry, 2005). Existen en la bibliografía varias evidencias de que la incorporación en las pasturas de forrajes de alta calidad nutricional como las leguminosas, conducen a una menor emisión de CH₄ por unidad de materia seca ingerida (MSI), comparado con la emisión obtenida en pasturas de baja calidad, como es el caso de algunas gramíneas forrajeras (Hammond *et al.* 2011, Vlaming 2008, Waghorn y Woodward 2006, Ramírez-Restrepo y Barry 2005, Waghorn *et al.* 2002). En este sentido, Waghorn y Woodward (2006) reportan un ensayo donde

ovejas alimentadas con *Trifolium repens* o *Lotus pedunculatus* producen menos CH₄ por unidad de MS ingerida (12 g/kg MSI) en comparación a las emisiones obtenidas en dichas ovejas pero consumiendo *Lolium sp.* (26 g/kg MSI). Esto se explica por un menor contenido de fibra de las leguminosas, mayor proporción de carbohidratos rápidamente fermentables y mayor tasa de pasaje (y por ende menor tasa de fermentación) (Kasuya y Takahashi, 2010), provocando así una bajada del pH ruminal (explicado por un menor tiempo de rumia y salivación) y una reducción de la relación acético/propiónico (Williams *et al.*, 2005), lo cual baja el exceso de H₂ en rumen y por ende la metanogénesis.

Cuando las pasturas son predominantemente a base de gramíneas (naturales y/o sembradas) se da una mayor pérdida de energía bruta ingerida como CH₄ en relación a la obtenida en predominio de leguminosas, ya que, las gramíneas proporcionan mayores niveles de fibra que estimulan la rumia, menor tasa de pasaje y mayor tasa de fermentación, con altos niveles de acético e H₂, todo lo cual afecta la metanogénesis (Waghorn y Woodward, 2006). Este efecto también se ha estudiado en pasturas mezclas de gramíneas y leguminosas. Se ha reportado que si se incluye una proporción menor a 30% de leguminosas, en una mezcla de gramíneas y leguminosas, tampoco se logra un efecto en la reducción de la emisión de CH₄ (Lee *et al.*, 2004), ya que no se logra afectar la tasa de pasaje y fermentación ruminal, ni se logran modificar las relaciones de AGV requeridas para disminuir la metanogénesis. En cambio, se ha reportado que incorporar proporciones de 30% o mayores de leguminosas, disminuye un 10-16% la producción de CH₄ (Lee *et al.* 2004, McCaughey *et al.* 1999). En este sentido, Knight *et al.* (2008), reportan que animales consumiendo una mezcla compuesta por 70% *Lolium sp.* y 30% *Trifolium repens*, logran una reducción del 17-24% de la producción de CH₄, en comparación a la emisión obtenida por dichos animales pero en una pastura 100% *Lolium sp.* Siguiendo la misma línea de trabajo, Lee *et al.* (2004) reportan que animales consumiendo una mezcla de *Trifolium repens* y *Lolium sp.*, y usando proporciones crecientes de *Trifolium repens* en la mezcla forrajera, logran un incremento lineal de la MS ingerida y una reducción de la producción de CH₄ por unidad de MS ingerida.

En este trabajo se observó que animales alimentados con una pastura mezcla, con 60% *Trifolium repens*, consumieron 20,5 kg MS/vaca/d, con una emisión de CH₄ de 18,1 g /kg MS ingerida. Cuando se compararon estos valores con los obtenidos en una pastura sin incorporación de leguminosas (100% *Lolium sp.*) se observó en este último caso, un menor consumo (15,6 kg MS/vaca/d) y mayor emisión de CH₄ por unidad de consumo (21,7 g CH₄/kg MS ingerida), lo cual concuerda también con lo planteado por Knight *et al.* (2008). Por lo tanto, se puede considerar a la incorporación de altos niveles de leguminosas en las mezclas forrajeras como una estrategia de mitigación de las emisiones de CH₄ en animales en pastoreo (Vlaming, 2008).

Se reporta en la bibliografía que el efecto en la reducción de la emisión de CH₄ ruminal a partir de la incorporación de leguminosas en las pasturas debe tener en cuenta además, aspectos como la presencia de Taninos Condensados (TC) en algunas leguminosas como es el caso del género Lotus, que si bien no es objeto de estudio de este trabajo no se debe dejar de mencionar. Según Ramírez-Restrepo y Barry (2005), Lassey *et al.* (1997) esta especie forrajera posee una concentración de TC de 27 g/kg MS en promedio (para las condiciones de Nueva Zelanda). Según dichos autores, esta forrajera permite un incremento del consumo de MS y de la producción de leche y una reducción de la producción de CH₄/kg MSI, con respecto a dietas en base a gramíneas puras. En este sentido, Woodward *et al.* (2004) reportan en vacas lecheras en pastoreo de *Lotus corniculatus* un incremento del consumo de MS de 17% (en relación a los valores obtenidos en *Lolium perenne*) con una reducción del 18% de la emisión de CH₄ (19,9 vs. 24,5 g CH₄/kg MSI, respectivamente). Los autores adjudican un 13% de dicha reducción de la emisión de CH₄ al efecto de los taninos del Lotus (con niveles de TC no reportados). Si bien existen varios trabajos que hacen referencia al efecto de los TC sobre la disminución de la emisión de CH₄, aún no se conoce claramente la causa que provoca dicha disminución (Klein *et al.*, 2008), mencionándose en la bibliografía por ejemplo que los TC forman enlaces con las proteínas del forraje (reversibles a pH ácido), lo que reduce la degradación de la proteína a nivel ruminal (Ramírez-Restrepo y Barry, 2005) o que los TC generan una

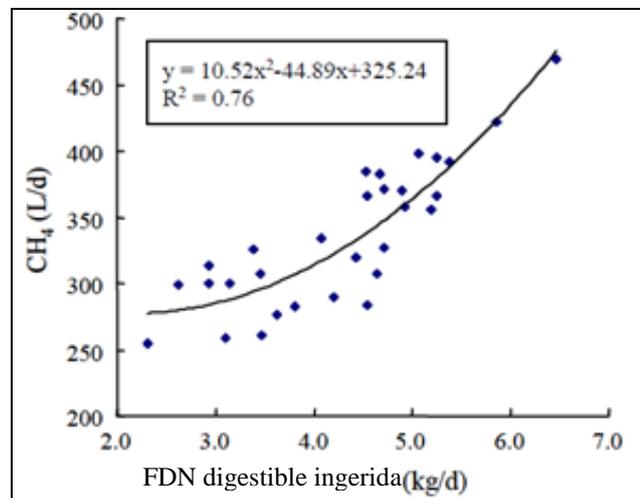
inhibición de metanógenos en el rumen (Martin *et al.*, 2010). Por otro lado, al momento de evaluar la incorporación de leguminosas como contribuyentes a la reducción de las pérdidas de energía como CH₄, se debe tener en cuenta también la presencia de compuestos como la pectina (hidratos de carbono que forman el 10-12% de la MS de las leguminosas). En este sentido, Waghorn y Woodward (2006) ofrecieron una dieta rica en pectina (10% de MS), a ovejas y observaron que esta se convertía principalmente en CH₄ sin afectar la producción de AGV, lo que según estos autores podría explicar parte de las diferencias entre las emisiones de CH₄ procedentes de animales alimentados con leguminosas.

Por otro lado, la comparación entre gramíneas C3 y C4 en la bibliografía también arroja diferencias sobre la producción de CH₄ entérico, pero con un efecto potencial menor sobre dicha reducción que los factores explicados anteriormente. En este sentido, Archimède *et al.* (2011), usando un meta-análisis para comparar la emisión de CH₄ entre gramíneas C3 y C4, con contenidos de FDN, digestibilidad y nivel de consumo similares, concluyen que las gramíneas C4 producen 10-17% más CH₄/kg MSI que las gramíneas C3, explicado principalmente por el mayor tiempo de retención en el rumen. La mayor emisión de CH₄ por parte de las gramíneas C4 se puede atribuir a que estas tienen mayores contenidos de FDN, por lo cual puede alcanzar valores de 8,6-9,6% de la energía bruta ingerida por el animal perdida como CH₄ (Archimède *et al.*, 2011).

Además de las diferencias entre forrajes, existen trabajos que mencionan factores adicionales de la dieta en general, como determinantes de la emisión de CH₄, entre ellos: la composición química y la digestibilidad.

En relación a la composición química, Kasuya y Takahashi (2010), Pinares-Patiño *et al.* (2003b) reportan una alta correlación entre la producción de CH₄ y la FDN ingerida (kg/d) ($r=0,73$ y $0,99$; $p<0,01$, respectivamente). Kasuya y Takahashi (2010) reportan además una alta correlación entre la emisión de CH₄ y el consumo de FDN digestible ($r = 0,84$; $p<0,01$) (Fig. 1).

Figura 1. Relación entre FDN digestible ingerida y CH₄



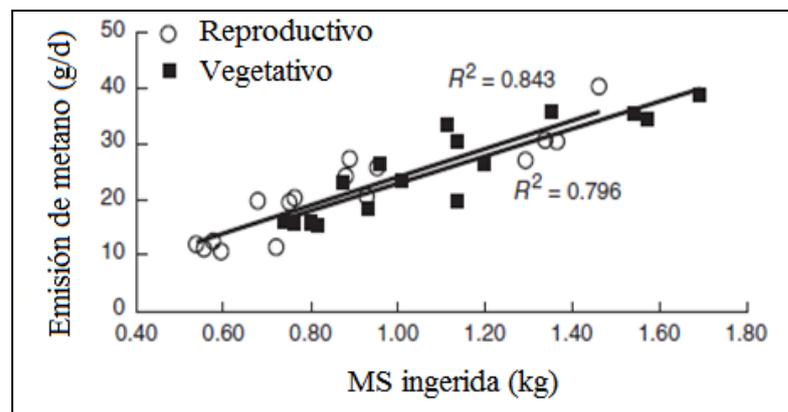
Fuente: Kasuya y Takahashi (2010)

Este efecto de la FDN digestible ingerida radica en que esta es una medida del consumo de carbohidratos estructurales digestibles, y la producción entérica de CH₄ está asociada mayoritariamente a la fermentación y digestión de la fibra en el rumen, por lo que este indicador es reconocido como un buen predictor de la producción de CH₄ ruminal.

En relación a la digestibilidad de las pasturas, se ha evidenciado que existe una relación negativa entre las pérdidas de EBI en CH₄ y la digestibilidad de los forrajes (Harper *et al.* 1999, Vermorel 1995). En cambio en un estudio donde se alimentaron corderos con *Lolium sp.* con 67 y 77% de Materia Orgánica digestible (MOD), que corresponde a estado reproductivo y vegetativo, respectivamente, no se reportaron diferencias significativas en la producción de CH₄ (23,7 y 22,9 g CH₄/kg MSI, respectivamente) (Molano y Clark, 2008). Esta falta de relación entre la digestibilidad y le emisión de CH₄ fue atribuida por los autores a que las características de la dieta utilizada no indujo cambios en el ambiente ruminal (variación de pH, tasa de pasaje, etc.) que afectara la relación de AGV producidos y por ende la producción de CH₄. En cambio, se evidenciaron efectos sobre el

consumo: en estado reproductivo el rango de consumo fue de 0,54 a 1,46 kg/d y en estado vegetativo de 0,74 a 1,69 kg/d, lo que está asociado a la calidad del forraje. Este trabajo deja en evidencia que la relación entre las pérdidas de EBI en CH₄ y la digestibilidad de los forrajes, por si sola, no permite explicar las variaciones en las emisiones de CH₄ ruminal, lo cual también fué reportado por Clark *et al.* (2011), y Johnson y Johnson (1995). En este sentido, Molano y Clark (2008), evidenciaron un efecto de las dietas sobre el consumo (Fig. 2) y de este sobre la producción de CH₄.

Figura 2. Relación entre la producción de CH₄ y la MS consumida, en raigrás en estado reproductivo y vegetativo



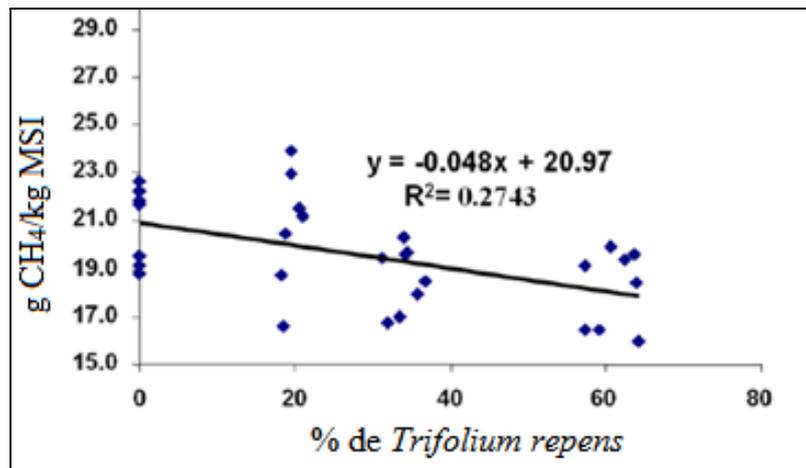
Fuente: Molano y Clark, 2008

Hindrichsen *et al.* (2006) y Benchaar *et al.* (2001) hacen referencia a que además de la digestibilidad de los forrajes se debe observar el consumo, evidenciando una relación negativa entre este último y las pérdidas de CH₄/kg MSI, la cual a su vez, es más manifiesta en dietas con alta digestibilidad. Robertson y Waghorn (2002) en un trabajo con vacas lecheras en pastoreo reportan que en primavera estos animales perdieron entre el 4,5 al 5,3% de la EBI como CH₄, mientras que durante el pastoreo en verano las pérdidas fueron del orden del 6 al 7% de la EBI como CH₄, asociado con una disminución de la digestibilidad del forraje y del consumo (por mayor tiempo de retención). Por ello, parecería que alimentar con forrajes de alta digestibilidad, a niveles que tengan incidencia sobre los parámetros ruminales (pH, producción y relación de AGV, tasa de pasaje, etc.) y por ende sobre el consumo,

puede ser una estrategia para disminuir las emisiones de CH₄, lo cual coincide con lo reportado por Clark *et al.* (2011), Kasuya y Takahashi (2010), Hart *et al.* (2009), Williams *et al.* (2005). Esto a su vez, conduciría a una reducción de la emisión debido a la mejora de la productividad animal.

No se debe desconocer que existen factores animales que también inducen una variación individual en la emisión de CH₄ diaria. Es sabido que existen variaciones en la producción de CH₄ tanto a nivel de individuo como de animales dentro de un mismo rodeo (Pinares-Patiño *et al.* 2007, Pinares-Patiño *et al.* 2003a). A nivel del animal, la producción de CH₄ depende de la eficiencia de la digestión fermentativa en el rumen. Los posibles factores asociadas a la variación en el rendimiento diario de CH₄ pueden ser atribuibles a características propias del tracto digestivo como velocidad de consumo, producción y composición de saliva, capacidad ruminal y tasas de pasaje de la fracción sólida y líquida en el rumen (Varga y Kolver, 1997). En relación a la variabilidad en la producción de CH₄ entre animales de un mismo rodeo, esta puede ser explicada por diferencias en los ecosistemas microbianos y características del tracto digestivo, como ya se mencionó (Martin *et al.* 2008, Vlaming 2008). En este sentido, Lee *et al.* (2004) en un trabajo con vacas Holstein alimentadas *ad libitum* con una mezcla de *Trifolium repens* y *Lolium sp.*, y usando proporciones incrementales de *Trifolium repens* en la dieta, no lograron establecer una relación significativa ($R^2=0,27$) entre el consumo incremental de *Trifolium repens* y la pérdida de energía consumida como CH₄, debido a la alta variabilidad individual en las emisiones (Fig. 3).

Figura 3. Influencia del contenido de *Trifolium repens* en la pastura sobre la emisión de CH₄ entérico de vacas lecheras



Fuente: Lee *et al.* (2004)

Dicha variabilidad puede ser a futuro una alternativa de selección genética (Lee *et al.*, 2004), lo que permitiría la mitigación de las emisiones de CH₄ por unidad de MSI.

1.2. METODOLOGÍA PARA LA ESTIMACIÓN DE CH₄ ENTÉRICO EN ANIMALES EN PASTOREO

1.2.1. Fundamentación

La técnica que utiliza SF₆ como trazador para la medición de las emisiones de CH₄ entérico fue desarrollada por Kristen A. Johnson y Hal H. Westberg, en Washington State University, Pullman, Washington, EE.UU (Johnson *et al.*, 1994).

El desarrollo de esta técnica se fundamenta en el conocimiento de que aproximadamente el 95% del CH₄ ruminal (87% de la producción total) es eructado y que el 89% del CH₄ generado en intestino grueso (11% del total) se elimina a través de los pulmones. Así, aproximadamente el 99% de la producción total de CH₄ es exhalado por boca y nariz (83% por eructación y 16% por exhalación) (Murray *et al.*, 1976).

Un aspecto clave de la técnica es el uso del trazador. Para ello, se introduce en el rumen del animal una cápsula conteniendo SF₆, con una tasa de liberación conocida. El trazador se acumula en el rumen, y es posteriormente liberado por eructos junto con el CH₄. El principio de esta técnica radica en que se ha demostrado que la razón entre las concentraciones medias de CH₄ y SF₆, determinadas en dichas muestras de aire, es una buena aproximación a la razón entre la tasa de emisión de cada cápsula y la tasa media de emisión de CH₄ (Johnson *et al.*, 1994). Entonces, si se conoce la cantidad total de trazador liberada en el lapso de recolección de la muestra, multiplicando esta cantidad por la razón de las concentraciones CH₄/SF₆, se obtiene la emisión de CH₄ en el lapso de recolección de la muestra.

En relación al trazador utilizado para la medición de las emisiones de CH₄, este debe satisfacer algunas condiciones (Primavesi *et al.*, 2004):

- 1) la tasa de liberación de la cápsula debe ser constante y predecible,
- 2) el marcador no debe influir en la fermentación ruminal,

- 3) debe detectarse a bajas concentraciones,
- 4) debe ser inerte y no debe ser tóxico. Varios trazadores fueron propuestos y usados para estimar CH₄ pero solo el SF₆ cumple satisfactoriamente con los requisitos propuestos (Johnson *et al.*, 2007).

Una de las principales ventajas de la técnica de trazado por SF₆ frente al uso de cámaras atmosféricas es que elimina la necesidad de encerrar al animal, permitiendo así que este se pueda mover y pastorear libremente. Además, no es necesario tomar muestras en el rumen de los animales dado que todo el CH₄ producido es excretado ya sea, por exhalación o eructación y por consiguiente solo una pequeña fracción, pero representativa de esta excreción es recogida alrededor de la boca y la nariz de cada animal, el cual relacionándolo con la cantidad de trazador muestreado se traducirá en una buena estimación de la producción de CH₄. La técnica de trazado por SF₆ permite la medición de las emisiones de gases a partir de animales individuales bajo condiciones de pastoreo y tiene un importante potencial para superar la falta de información en esta área (Pinares-Patiño *et al.*, 2007).

A pesar de las ventajas de la técnica de SF₆, algunos investigadores se han cuestionado si existen diferencias en los valores de CH₄ obtenidos en cámaras atmosféricas en comparación a los valores obtenidos en pastoreo, para lo cual han realizado comparaciones entre ambas técnicas (Pinares-Patiño *et al.* 2011, Grainger *et al.* 2007, McGinn *et al.* 2006, Lassey 2007, Boadi y Wittenberg 2002, Johnson y Johnson 1995, Johnson *et al.* 1994). Dichos investigadores reportan que no se encontraron diferencias significativas en los valores promedio de emisión de CH₄ utilizando la técnica en animales en pastoreo en relación a los valores medios obtenidos por calorimetría. A modo de referencia, Grainger *et al.* (2007) reportan que las emisiones de CH₄, en vacas lecheras, obtenidas con la técnica de SF₆ fueron similares a las obtenidas en cámaras atmosféricas (331 vs. 322 g de CH₄/d/vaca, respectivamente). En el mismo sentido, McGinn *et al.* (2006) reportan que la técnica de SF₆ subestimó los valores de CH₄ en un 4% respecto al valor obtenido en cámaras, aunque dicha diferencia no fue significativa (P=0,05).

1.2.2. Cápsula emisora de SF₆

Como se mencionó anteriormente, no se han encontrado diferencias significativas en los valores promedio de emisión de CH₄ utilizando la técnica de trazado por SF₆ y las mediciones en cámaras atmosféricas. Si bien la técnica de trazado por SF₆ original presenta ciertas ventajas frente al uso de cámaras, no se debe desconocer que presenta una alta variabilidad entre animales (Lasey *et al.*, 1997), que puede estar afectada por la tasa de permeación de la capsula (Pinares-Patiño *et al.* 2011, Vlaming 2008). El origen de la alta variabilidad asociada con la técnica de trazado por SF₆ ha dado lugar a varias conjeturas y una de ellas se asocia con el comportamiento del trazador. Después de insertar la capsula de permeación en el rumen, se supone que el SF₆ se libera continuamente a una tasa igual a la pre-calibrada externamente y se acumula en el espacio libre sobre el líquido ruminal junto con los gases de fermentación (esencialmente CH₄ y CO₂). Podría ocurrir que el SF₆ emitido quede atrapado temporalmente en burbujas que se adhieren a las paredes del rumen hasta que su ruptura da a lugar una liberación repentina del trazador. De hecho, existen evidencias de la ausencia de SF₆ en algunas muestras de aire exhalado por ovejas (con tubos de permeación insertos en rumen) sobre intervalos de tiempos breves (unas horas) (Lasey *et al.*, 2011). Este efecto puede contribuir a una alta variabilidad en las estimaciones de las emisiones de CH₄. Además, Pinares-Patiño *et al.* (2011) reportaron que concentraciones de SF₆ en muestreos integrados sobre 24 h recogidas de cámaras atmosféricas presentaron anomalías de este tipo. Finalmente, en experimentos con muestreos sobre 24 h ocasionalmente se encuentran valores de emisión tan altos o tan bajos, que son inexplicables desde un punto de vista fisiológico. En este sentido, períodos de integración de las muestras de 5 o 10 días, podrían evitar estas variaciones en la tasa de emisión del trazador desde el rumen, llevando a estimaciones más precisas de las emisiones (Gere, 2012). Se debe tener en cuenta también que, durante períodos breves (algunas semanas) la tasa de permeación de la cápsula permanece constante, pero deja de serlo en períodos mayores (en el momento en que la cantidad de SF₆ disminuye significativamente). De esta manera, el uso de la capsula pre-calibrada es

válida para períodos de 60 o 90 días. A su vez, el comportamiento de la capsula no es constante en el rumen ya que el SF₆ es influenciado por la temperatura y la presión ruminal. En este sentido, la tasa de liberación del SF₆ de las capsulas puede influir en las estimaciones de CH₄ al utilizar la técnica de trazado por SF₆ y si se utilizan capsulas de mayor tasa de permeación se obtendrá un mejor resultado en la determinación del CH₄ ruminal (Vlaming, 2008).

Esta técnica se usa en Nueva Zelanda, Australia, Canadá, Estados Unidos, entre otros, para estimar la emisión de CH₄ en animales en pastoreo (Grainger *et al.* 2007, Lassey 2007, Pinares-Patiño *et al.* 2003b, Boadi y Wittenberg 2002, Lassey y Ulyatt 1999, Lassey *et al.* 1997, Johnson *et al.* 1994). En Uruguay existe un único antecedente de trabajo dirigido a medir emisiones de CH₄ por fermentación ruminal en vacunos utilizando esta técnica (Mieres *et al.*, 2003). En Argentina (Bárbaro *et al.*, 2008) y Brasil (Azevedo do Amaral, 2011) esta técnica ha sido recientemente utilizada en la medición de emisiones de CH₄ por fermentación ruminal, pero con algunas modificaciones.

1.2.3. Adaptación de la técnica de SF₆ para mediciones en tiempo prolongado

La técnica original, desarrollada por Johnson *et al.* (1994) consiste en coleccionar aire a pocos centímetros del ollar del animal durante un lapso de tiempo establecido (~ 24 h), donde el efecto de las liberaciones ruminales, conduce a que en la muestra recolectada la concentración de CH₄ sea mayor que en una muestra de aire “puro”. Habitualmente el recipiente de muestreo es un cánister de PVC (en forma de V) con un volumen comprendido entre los 1,5–2,5 L, diseñado para ser montado sobre el cuello de los animales. El recipiente debe estar dotado de una válvula que permite preservar el vacío en su interior, y su estanqueidad (capacidad de conservarlo) comprobada.

El grupo de Físico-química Ambiental de la Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires (UNICEN), ha realizado algunas adaptaciones a la técnica

de Johnson (o de trazado por SF₆). Como ya se mencionó, en la técnica original de Johnson, se propone el uso de recipientes de PVC, estos han sido utilizados por la mayoría de los grupos de investigación (Grainger *et al.* 2007, McGinn *et al.* 2006, Lovett *et al.* 2003, Lasseby *et al.* 1997), sobre todo por razones de bajo costo y facilidad de manipulación (cierres con pegamentos, posibilidad de deformaciones a moderada temperatura, etc.). Sin embargo, se han detectado algunas dificultades con el uso de este tipo de recipientes de recolección, que implican complicaciones en el sellado de los cánisters con pegamento, lo que no permite garantizar la estanqueidad de los recipientes recolectores. Además, medidas sucesivas de la presión dentro de los recipientes recolectores (luego de haberlos vaciado) ponen en evidencia un incremento inicial de la presión muy alto, hasta valores cercanos a los 10 mbar y que luego disminuía con el pasar de las horas. Este comportamiento es atribuido al desgase de alguna de las sustancias presentes en el PVC o en los pegamentos y selladores utilizados para unir el recipiente recolector, lo que interfiere luego en la calidad de los cromatogramas. Estas evidencias promovieron la posibilidad de utilizar recipientes contruidos con otros materiales, como el acero inoxidable (Gere y Gratton, 2010). Luego de varios ensayos se ha observado que los recipientes de acero inoxidable (de 0,5 L) se mantienen prácticamente estancos por largos períodos, conservando el vacío que se efectúa en su interior y los cromatogramas son mucho más limpios y confiables. A los mismos se les adosa la base de un conector rápido Swagelok®, que permite mantener cerrado el tubo durante el periodo en que no se colecta muestra (Gere, 2012).

Otra modificación importante a la técnica de SF₆ (Johnson *et al.*, 1994) es el empleo de un restrictor de flujo diferente, con la ventaja de poder ser regulable para obtener flujos más pequeños que los requeridos para la técnica tradicional. En la técnica original, se usa un capilar de acero inoxidable, donde la restricción está dada por la longitud del capilar y diámetro del mismo (Johnson *et al.*, 2007). Para periodos de 1 h de muestreo se necesita un pequeño capilar, pero para periodos de 24 h este debe ser del orden de 1 m. Es posible emplear pequeños tramos de capilar, apretando en una zona específica hasta lograr el flujo deseado. El tiempo de muestreo es

definido por el tiempo requerido para acumular 500 mbar de muestra en el tiempo deseado, el cual es de un día o menos. La modificación propuesta respecto a la técnica original radica en el uso de dispositivos ajustados por la comprensión de una bolilla de acero contra el borde de un orificio cilíndrico. De esta forma, la posibilidad de poder disminuir la tasa de ingreso de aire al recipiente, generó la posibilidad de extender los periodos de muestreo a varios días. Estas modificaciones fueron comparadas bajo condiciones controladas con la técnica tradicional (periodos de muestreo de 24 h) en Nueva Zelanda empleando 5 vacas lecheras. En dicho trabajo concluyen que las emisiones de CH₄ no difieren entre ambos sistemas de recolección (Pinares-Patiño *et al.*, 2012). A partir de lo cual se concluye que las modificaciones realizadas a la técnica original representan una simplificación logística ya que es posible reducir el número de análisis, mejorando la conservación de las muestras y la calidad de los cromatogramas, lo que la convierte en una alternativa económica y logísticamente conveniente y además reduce el estrés provocado en los animales durante los experimentos (Gere, 2012).

Estas adaptaciones a la técnica de Johnson han permitido diseñar experimentos con animales en pastoreo en tiempos mayores a los estipulados en la metodología original (Gere y Gratton 2010, Gere *et al.* 2007) y se aplicaron en el presente trabajo. De esta manera, se emplearon recipientes recolectores de acero inoxidable de 0,5 L como recipientes de muestreo y el ingreso de la muestra fue regulado mediante dispositivos ajustables.

1.3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1.3.1. Hipótesis

La mayor proporción de leguminosas en las mezclas forrajeras permite reducir las emisiones de CH₄ (expresadas tanto por unidad de alimento consumido como por unidad de producto) de vacas lecheras en pastoreo sin suplementación.

1.3.2. Objetivo general

Determinar a través de la técnica de trazado por SF₆, adaptada para la medición en tiempo prolongado, el efecto de pasturas dominadas por gramíneas o leguminosas sobre las emisiones de CH₄ entérico de vacas lecheras en pastoreo.

1.3.3. Objetivos específicos

- Poner a punto la técnica de trazado por SF₆ para la cuantificación de las emisiones de CH₄ entérico de vacas lecheras en pastoreo, utilizando la adaptación de la técnica para la colecta de muestras en un periodo de tiempo prolongado (5 días).
- Evaluar el efecto del tipo de pastura (dominada por leguminosas o por gramíneas) sobre las emisiones de CH₄ entérico de vacas lecheras en producción.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. PUESTA A PUNTO DE LA TÉCNICA DE TRAZADO POR SF₆ PARA MEDICIONES EN TIEMPO PROLONGADO

La puesta a punto de la técnica se realizó en el periodo comprendido entre octubre de 2009 y setiembre de 2010, para ello se siguieron las recomendaciones del grupo de Físico Química Ambiental de la Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires (Buenos Aires, Argentina) que realizó las adaptaciones a la técnica de Johnson *et al.* (1994), que permiten realizar experimentos con animales en pastoreo a lo largo de varios días de muestreo. En este trabajo se realizó la colecta de muestras de aire exhalado a lo largo de periodos de 5 días.

2.1.1. Homologación de recipientes recolectores

Se utilizaron recipientes recolectores de acero inoxidable de 0,5 L (Ingeniería Solydes S.A, Provincia de Buenos Aires, Argentina) (Fig. 4), que presentan una conexión rápida Swagelok® adosada y son testeados para garantizar la estanqueidad. Los recipientes fueron vaciados a una presión de 0,5 mbar y se controló la presión dentro de los mismos a las 48 h (siguiendo las recomendaciones del grupo de Físico Química Ambiental, UNICEN), para corroborar que habían conservado eficientemente el vacío.

Figura 4. Recipiente recolector de muestra de acero inoxidable



Los recipientes, previo a comenzar el ensayo de campo, fueron limpiados con gas nitrógeno (N_2) de alta pureza para evitar la contaminación de las muestras con aire espúreo. El lavado se efectuó llenando los recipientes con 2000 mbar de N_2 y luego fueron evacuados a 0,5 mbar. Este procedimiento se realizó dos veces en cada tubo quedando en condiciones de ser utilizado en el experimento.

2.1.2. Homologación de restrictores de flujo

De acuerdo a los ajustes realizados por el grupo de Físico Química Ambiental (UNICEN), las muestras son colectadas de forma continua por periodos establecidos mediante el ajuste de los restrictores de flujo (Fig. 5) y el mismo puede calibrarse para la toma de muestra continua desde las 24 h hasta varios días.

Figura 5. Restrictores de flujo de muestra



Estos restrictores, ofrecen una impedancia hidráulica de manera tal que los recipientes de recolección se van llenando de muestra progresivamente. En este trabajo los restrictores fueron calibrados para recolectar 0,5 bar dentro del recipiente, en un periodo de 5 días.

Tanto los restrictores de flujo como los recipientes recolectores fueron testeados en laboratorio para corroborar su correcto funcionamiento utilizando un vacuómetro tipo Pirani (0,01-10 mbar) y un manómetro diferencial piezoeléctrico (0-2000 mbar).

2.1.3. Cápsulas emisoras de SF₆

Las cápsulas emisoras de SF₆ fueron elaboradas por National Institute of Water & Atmospheric Research (NIWA, Wellington, Nueva Zelanda). Las mismas consisten en una barra de bronce que posee una cavidad en la que contiene el SF₆ y está cerrada mediante una membrana de teflón (mecánicamente sostenida por una microgrilla de acero inoxidable) (Johnson *et al.*, 2007) (Fig. 6).

Figura 6. Cápsula emisora de SF₆



En la cápsula se encuentran en equilibrio las fases gaseosa y condensada de SF₆, lo cual a 39 °C (temperatura que simula la temperatura en el rumen), significa una presión de vapor de alrededor de 40 bar. Se origina, entonces, un flujo de gas a través de la membrana, prácticamente constante, cuyo valor está regulado por la temperatura.

Previo inclusión en el rumen, las cápsulas fueron calibradas colocándolas en un recipiente plástico inmerso en un baño maría a 39 °C, durante 4 semanas, para determinar la tasa de permeación (TP) de SF₆ (mg/d) de cada cápsula (Johnson *et al.*, 2007). Durante ese tiempo, las cápsulas fueron pesadas cada 3 días (a la misma hora) y los valores obtenidos se ajustaron mediante regresión lineal (masa vs. tiempo). De las 10 capsulas calibradas, se seleccionaron las 8 que presentaron la mayor TP (en el rango 6,915-6,093 mg/d; R² promedio= 0,9993 ± 0,00033) y se asignaron a los animales procurando la menor variación del SF₆ emitido entre cada lote (Garry

Waghorn, comunicación personal, 10 de marzo de 2010). Se introdujeron en el rumen una semana antes de comenzar el experimento, a los efectos de procurar una estabilización de la concentración de SF₆ en el rumen.

2.1.4. Bozales

Se utilizaron bozales diseñados para este tipo de trabajos ya que suelen ser apropiados para evitar la pérdida de muestras debida al contacto entre animales. En cada bozal se colocan dos recipientes recolectores, lo que permite la obtención de muestras duplicadas de cada animal (Fig. 7).

Figura 7. Sistema de muestreo colocado en el animal



2.2. ESTIMACIÓN DE LAS EMISIONES DE METANO EN PASTOREO

Las mediciones en los animales se realizaron en el Centro Regional Sur (34° 36' S de latitud; 56° 13' W de longitud; Progreso, Canelones, Uruguay), de la Facultad de Agronomía (Universidad de la República), en el periodo comprendido entre el 17 de octubre y el 27 de noviembre de 2010.

Se evaluaron dos tratamientos: una pastura en base a leguminosas (L): *Medicago sativa* (cv. Chaná), *Trifolium repens* (cv. Zapicán) y en menor proporción *Bromus auleticus* (cv. INIA Leona) y otra pastura en base a gramíneas (G): *Lolium multiflorum* (cv. LE 284) y en menor proporción *Lotus corniculatus* (cv. San Gabriel). Se utilizó un diseño de cuadrado latino 2*2 replicado, con 8 vacas lecheras Holando en lactación, y dos periodos de medición de 21 días cada uno (con 7 días de acostumbramiento a la dieta y 14 días de colecta de heces y de muestras gaseosas para determinar emisión de CH₄). Los animales fueron asignadas a los tratamientos en función de la producción de leche (24,9 (± 4,15) L/d), días de lactación (195 (± 7,3)) y peso vivo (536 (±17,7) kg). El pastoreo fue realizado en franjas diarias, apuntando a una asignación mínima de 30 kg MS/vaca/d (por encima de 5 cm), para no restringir el consumo en pastoreo (Peyraud *et al.*, 1996). Luego de cada ordeño los animales entraron a una nueva franja, la superficie asignada en cada franja fue calculada en función del forraje disponible.

2.2.1. Mediciones en las pasturas

La disponibilidad de biomasa pre-pastoreo de cada una de las pasturas fue estimada los días 9, 12, 16 y 19 de cada periodo experimental, mediante el corte de 3 franjas al azar (10 m x 0,5 m), utilizando para ello una cortadora de forraje Honda (modelo HRC 216, Japón), con una altura de corte de 5 cm (sobre el nivel del suelo). Luego se tiraron al azar dentro de cada franja dos cuadros de 0,3 m x 0,3 m, con el objetivo de determinar el forraje remanente al ras del suelo. Las muestras de forraje se pesaron en fresco y una muestra de aproximadamente 500 g se secó a 60 °C durante 48 h para la determinación de materia seca y análisis químico del forraje ofrecido. Además se realizaron al azar 30 mediciones de la altura de la pastura con una regla graduada (precisión ±1 mm), cubriendo toda la superficie de la franja diaria. El mismo procedimiento fue realizado post-pastoreo, para determinar la biomasa remanente (días 11, 14, 18 y 21 de cada periodo experimental). La biomasa total a ras del suelo se calculó como la suma de la biomasa medida por encima (5 cm) y por debajo de la altura de corte de la pastura. La utilización de forraje se

calculó como la diferencia entre la biomasa pre-pastoreo y post-pastoreo y se expresó en términos de porcentaje de la biomasa pre-pastoreo. La profundidad media de defoliación fue estimada por diferencia entre los valores de altura media de las plantas antes y después del pastoreo.

Para la determinación de la composición botánica de las pasturas pre y post-pastoreo, se cortaron con tijera 3 muestras de aproximadamente 100 tallos (al ras del suelo) en el borde de cada una de las franjas cortadas. Las 3 muestras se juntaron en una muestra compuesta que se acondicionó en una bolsa plástica y se almacenó congelada a -20 °C. En el laboratorio, se tomó una sub-muestra de cada una de estas muestras y se clasificó como leguminosas o gramíneas forrajeras y malezas. Luego cada una de estas sub-muestras fue cortada en estratos cada 5 cm y cada estrato separado en tallo, hoja, restos secos, inflorescencia y malezas. Estas fracciones fueron secadas en estufa a 60 °C durante 48 h para determinar MS de cada fracción.

Para determinar la calidad del forraje ofrecido, se determinó la digestibilidad *in vivo* para cada periodo experimental (días 7 a 21), en simultáneo al ensayo con vacas en pastoreo. Para ello se utilizaron 12 ovinos Corriedale castrados ($69 \pm 6,9$ kg PV) distribuidos al azar en 2 grupos de 6 animales que fueron colocados en jaulas de digestibilidad, con libre acceso al agua. Diariamente se cortó el forraje con la cortadora Honda (modelo HRC 216, Japón) y fue suministrado a los animales (una vez por día, a las 10 am) según el tratamiento correspondiente. Se realizó un periodo de acostumbramiento (10 días), seguido por un periodo de 5 días con colecta total de heces, forraje ofrecido y rechazo. En el periodo de acostumbramiento se permitió el consumo de MS *ad libitum*, de modo tal de tener un rechazo equivalente al 10% del ofrecido. Durante el periodo de mediciones, en cada caso se extrajo una muestra diariamente del forraje ofrecido, del rechazo y de las heces de cada animal. Estas muestras colectadas diariamente se secaron en estufa a 60 °C para determinación de MS y luego se almacenaron para constituir una muestra compuesta por animal y periodo hasta su ingreso al laboratorio para las determinaciones de composición química.

2.2.2. Mediciones en los animales experimentales

La Materia Orgánica ingerida (MOI, kg/d) por vaca fue calculada usando óxido de cromo (Cr_2O_3) para estimar la excreción fecal de MO (kg MO/d) por medio del contenido de nitrógeno fecal y del contenido de fibra detergente ácida fecal para el cálculo de la digestibilidad de la MO de la pastura consumida por las vacas, a partir de la ecuación de indicadores fecales ajustada por Comeron y Peyraud (1993): $\text{DMO} = 0,791 + 0,0334 \text{ Nf} - 0,0038 \text{ FDAf}$ ($R^2=0,89$).

Donde: DMO es la digestibilidad de la MO (g/kg MO), Nf es la concentración de nitrógeno de la MO fecal (g/kg MO) y FDAf es la concentración de fibra detergente ácido en la MO fecal (g/kg MO).

Un concentrado conteniendo óxido de cromo (20 g Cr_2O_3 /kg MS de concentrado) fue preparado y ofrecido a cada animal en el momento del ordeño (2 veces al día), a razón de 150 g. El concentrado conteniendo el marcador externo fue proporcionado a los animales desde el día 1 del periodo experimental, con el objetivo de alcanzar un estado de equilibrio a nivel ruminal. Previo al inicio del ensayo se extrajeron muestras fecales de cada vaca que fueron utilizadas para confeccionar los estándares de cromo. La colecta de las heces se realizó diariamente, dos veces por día luego de cada ordeño, desde el día 8 al 21. Cada una de las colectas fue identificada y secada en estufa a 60 °C durante 96 h para determinar MS, concentración de cromo y composición química.

La producción individual de leche fue medida dos veces por día, en el ordeño de la mañana (6–6.30 h) y en el ordeño de la tarde (17–17.30 h). El contenido de grasa y proteína de la leche fue determinado en 8 días por periodo experimental (días 9 a 12 y 16 a 19). Las vacas fueron pesadas al inicio y al final de cada periodo experimental.

2.2.2.1. Medición de la emisión de CH₄

Previo al inicio del periodo experimental (7 días antes), se le colocó a cada uno de los animales una capsula emisora de SF₆ (con una tasa de permeación diaria promedio de $6,582 \pm 0,2712$ mg/d), utilizando un lanza bolo ruminal. Se colocaron 2 recipientes de recolección de muestra por animal para aumentar la eficiencia de muestreo, cada par de recipientes permaneció en el animal durante los 5 días de muestreo. Además de las muestras colectadas de los animales, se colectó una muestra de aire atmosférico en la proximidad de las parcelas experimentales para determinar el nivel base de CH₄.

Las muestras de gases se tomaron durante dos sub-períodos de 5 días en cada período de medición (en los días 10 a 14 y 16 a 20). Al final del primer sub-período (5 días), se sustituyó el juego de recipientes recolectores por otro par (por animal). Las muestras se analizaron inmediatamente después de finalizar cada periodo experimental.

2.3. ANÁLISIS QUÍMICOS

En el Laboratorio de Nutrición Animal de la Facultad de Agronomía (Universidad de la República), se determinó el contenido de materia seca analítica (MS) de las muestras de forraje y de heces por secado a 105 °C durante 24 h, las muestras luego fueron molidas utilizando un tamiz de malla de 1 mm. El contenido de cenizas (C) se determinó en un horno de Mufla a 600 °C durante tres horas y la proteína bruta (PB) por el método Kjeldahl según AOAC (1990). El contenido de fibra detergente neutro (aFDN_{mo}) se determinó sin sulfito de sodio y con amilasa estable al calor. La fibra detergente ácido (FDAmo) y lignina detergente ácido (lignina) fueron determinados con tecnología Ankom (Fiber analyzer 200, Ankom Technology Corporation, Fairport, N.Y.) de forma secuencial (corregido por cenizas) por el método de Van Soest *et al.* (1991). La Energía bruta se determinó utilizando

una bomba calorimétrica adiabática (Gallenkamp Autobomb; Loughborough, Leics, Reino Unido).

En las muestras de leche se analizó el contenido de grasa, proteína y lactosa con espectroscopia infrarroja usando Bentley 2000 (Bentley Inc. EE.UU.).

La concentración del cromo en heces fue determinada por espectrometría de absorción atómica (Perkin-Elmer 2380, Norwalk, Connecticut, USA) usando una llama de acetileno según los procedimientos descritos por William *et al.* (1962). Los estándares de cromo fueron realizados usando muestras fecales extraídas previo al inicio del ensayo. También se determinó el cromo contenido en la ración suministrada a las vacas para verificar la cantidad suministrada.

Para la determinación de la proporción de taninos condensados (TC) en las pasturas, se utilizó el método de la Vainillina, el cual está basado en una colorimetría de los complejos formados entre la vainillina y los taninos condensados en una solución de ácido clorhídrico con metanol (Schofield *et al.*, 2001).

Las concentraciones de CH₄ y SF₆ fueron determinadas por cromatografía gaseosa en el laboratorio del Instituto de Investigaciones en Físicoquímica (INFIQC) de la Universidad Nacional de Córdoba (Córdoba, Argentina). Para CH₄ se utilizó un loop de 3 ml, una columna HP-PLOTQ y un detector de ionización de llama, los picos de CH₄ cuantificables se comparan contra un estándar de concentración conocida. Para el SF₆ se utilizó un loop de 10 ml, una columna HP-MOLSIV y un detector de captura electrónica. Los estándares para la calibración se realizaron a partir de patrones diluidos en aire sintético en un intervalo de 1,5 a 44 ppm y 25 a 250 ppt para CH₄ y SF₆ respectivamente. Se analizaron las muestras por duplicado y en los casos en que fue posible (la cantidad de muestra fue suficiente) se realizó por triplicado.

Luego de tener los análisis cromatográficos de las muestras, la emisión de CH₄ por animal se calculó utilizando la tasa de liberación de la cápsula de SF₆ y los resultados obtenidos de la concentración de CH₄ y SF₆, utilizando la siguiente expresión:

$$\text{CH}_4 \text{ (g/d)} = \text{TPSF}_6 \text{ (g/d)} * [\text{CH}_4]/[\text{SF}_6]$$

donde: TPSF₆ es la tasa de liberación de SF₆ de la cápsula, [CH₄] y [SF₆] son las concentraciones de estos gases (en ppm y ppt, respectivamente) por encima de las concentraciones atmosféricas.

2.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Todas las mediciones realizadas en los animales fueron analizadas de acuerdo al diseño de cuadrado latino 2*2, usando el PROC MIXED del paquete estadístico SAS (2001), según el siguiente modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + P_i + T_j + A_k + \varepsilon_{ijk}$$

donde Y_{ijk} es la variable bajo consideración; μ es el efecto medio total; P_i es el efecto fijo del período (i=1 y 2); T_j es el efecto fijo del tratamiento (j=1 y 2) y A_k es el efecto animal (analizado como efecto aleatorio) (k= 1 a 8) y ε_{ijk} es el término experimental del error.

La producción y la composición de leche se analizaron como medidas repetidas en el tiempo, según un modelo autoregresivo de orden 1 (Littel *et al.*, 2000).

Todas las mediciones realizadas en las pasturas experimentales se analizaron de acuerdo al diseño de cuadrado latino 2*2, mediante ANOVA, utilizando el procedimiento GLM del paquete estadístico SAS (2001), según el siguiente modelo:

$$Y_{ij} = \mu + P_i + T_j + \varepsilon_{ij}$$

donde Y_{ij} es la variable bajo consideración; μ es el efecto medio total; P_i es el efecto fijo del período ($i=1$ y 2); T_j es el efecto fijo del tratamiento ($j=1$ y 2) y ε_{ij} es el término experimental del error. Tanto en el procedimiento MIXED como GLM fue chequeada la interacción tratamiento*período, y como en ningún caso fue significativo, no se incluyó en el modelo final, siguiendo las recomendaciones de Lorenzen y Anderson (1993). El test de comparación de medias utilizado fue el de la Mínima Diferencia Significativa.

3. RESULTADOS

3.1. CARACTERÍSTICAS DE LAS PASTURAS OFRECIDAS Y DEL FORRAJE DEFOLIADO

El Cuadro 1 presenta las características de las pasturas en términos de biomasa, composición botánica y composición química. La biomasa total disponible fue mayor en la pastura L con respecto a la pastura G (+ 836 kg MS/ha; $P < 0,001$), sin embargo ni la biomasa disponible por encima de la altura de corte de la pastura (5 cm) ni la altura de la biomasa a ras del suelo (29,5 cm en promedio) difirieron entre tratamientos (2165 kg MS/ha en promedio) (Cuadro 1).

Cuadro 1. Biomasa, altura, composición botánica y química de las pasturas experimentales

	Pasturas		
	L	G	P
Biomasa total (kg MS/ha)	4335	3499	0,0002
Biomasa por encima de 5 cm (kg MS/ha)	2309	2021	0,2201
Altura de la pastura pre-pastoreo (cm)	31	28	0,5153
<i>Composición botánica</i> ¹			
Relación Gramínea/Leguminosa (%MS)	40/60	76/24	<0,0001
<i>Composición química</i> ¹ (g/kg MS)			
MS (g/kg)	276	384	0,0008
MO	920	903	0,0461
PB	204	102	<0,0001
Taninos Condensados	4,6	2,8	0,0205
aFDN _{mo}	469	540	0,0260
FDAmo	265	312	0,0618
Lignina (as)	76	62	0,1149
EB (MJ/kg MS)	18,1	16,7	0,0017

¹ Por encima de la altura de corte de la pastura (5 cm)

La composición botánica de ambas pasturas fue significativamente diferente ($P < 0,0001$), tal cual como se pretendía en la determinación de los tratamientos. La pastura L presentó una mayor proporción de leguminosas (el 60% de la biomasa por encima de 5 cm era *Medicago sativa* y *Trifolium repens*), mientras que la pastura G presentó una mayor proporción de gramíneas (el 76% de la biomasa por encima de 5 cm era *Lolium multiflorum*). Ambas pasturas estaban en etapa reproductiva (la composición morfológica de cada pastura se presenta en Anexo 2).

La composición química (por encima de 5 cm) también difirió entre las pasturas evaluadas (Cuadro 1). La pastura G presentó mayor contenido de MS ($P < 0,001$), aNDFom ($P < 0,05$) y ADFom ($P < 0,1$) que la pastura L. Sin embargo, la mayor diferencia entre las pasturas se observó en el contenido de PB, la cual fue dos veces mayor en L que en G. El contenido de taninos condensados y de energía bruta fue menor en G que en L (Cuadro 1).

En las pruebas de digestibilidad *in vivo* con ovinos del forraje ofrecido (forraje cortado por encima de 5 cm), L presentó una mayor digestibilidad de la MS (73 g/kg MS; $P < 0,001$), de la MO (39 g/kg MS; $P = 0,01$) y de la aNDFmo (67 g/kg MS, $P < 0,001$) en comparación con la pastura G. Sin embargo, la digestibilidad de ADFmo fue similar entre ambas pasturas ($P = 0,15$) (Cuadro 2).

Cuadro 2. Digestibilidad *in vivo* del forraje ofrecido, evaluada con ovinos

	Pasturas		
	L	G	P
<i>Digestibilidad in vivo</i> ¹ (g/kg)			
MS	689	616	0,0006
MO	698	659	0,0103
aFDNmo	633	566	0,0016
FDAmo	525	489	0,1516

¹ Por encima de la altura de corte de la pastura (5 cm)

Las vacas que pastorearon la pastura G tuvieron una asignación de forraje mayor (ya que el área por vaca fue mayor) que las que pastorearon en la pastura L (+10 kg MS/vaca/d; $P < 0,05$), sin embargo en ambos tratamientos se logró una asignación de forraje por encima de la cantidad mínima estipulada de 30 kg de MS/vaca/d (por encima de 5 cm). La profundidad de defoliación (9,5 cm en promedio) y la utilización del forraje (42% en promedio) fueron similares entre tratamientos (Cuadro 3).

Cuadro 3. Asignación de forraje, profundidad de defoliación, utilización del forraje y composición química del forraje defoliado (dieta)

	Pasturas		
	L	G	P
Asignación de forraje ^{1 2} (kg MS/vaca/d)	35	45	0,0226
Altura de la pastura post-pastoreo (cm)	20	20	0,95709
Profundidad de defoliación (cm)	11	8	0,6436
Utilización de forraje ¹ (%)	46	37	0,2650
<i>Composición química¹ (g/kg MS)</i>			
MS (g/kg)	894	898	0,4399
MO	923	926	0,4481
PB	180	133	0,0225
Taninos Condensados	2,2	2,5	0,5119
aFDN _{mo}	464	482	0,6946
FDAmo	264	259	0,8578
Lignina (as)	47	38	0,0582
EB (MJ/kg MS)	18,7	19,0	0,5954

¹ Por encima de la altura de corte de la pastura (5 cm)

² Área asignada por vaca: 150 y 225 m² en L y G respectivamente

La composición química de la dieta fue similar entre ambas pasturas, a excepción del contenido de PB, el cual fue mayor en la pastura L (+47 g/kg MS; $P < 0,05$) respecto a G.

3.2. CONSUMO DE FORRAJE

La cantidad de heces excretada fue similar en ambos tratamientos (L y G) (4,5 kg de MO/vaca, en promedio). La digestibilidad estimada de la MO del forraje defoliado no difirió entre tratamientos (707 g/kg de MO, en promedio). Por consiguiente, la estimación del consumo diario de MS así como el de MO y FDN no difirieron entre las pasturas L y G (Cuadro 4).

Cuadro 4. Efecto del tipo de pasturas en heces, digestibilidad de la MO del forraje, y MO, MS y MO total digestible ingerida en pastoreo

	Pasturas		
	L	G	P
Heces (kg MO/d)	4,5	4,6	0,8476
Digestibilidad de la MO del forraje (g/kg MO)	711	704	0,1996
MO consumida (kg/vaca/d)	15,9	15,5	0,7558
MS consumida (kg/vaca/d)	17,3	16,8	0,7556
FDN consumido (kg/vaca/d)	8,0	7,9	0,9469
MOD consumida (kg/vaca/d)	11,4	10,9	0,6191

3.3. PRODUCCIÓN y COMPOSICIÓN DE LECHE Y CAMBIO DEL PESO VIVO

No se observaron diferencias entre los animales que pastorearon L y G en producción (20,3 kg/vaca, en promedio) ni en composición de leche (37,1 y 33,3 g/kg de leche, en contenido de grasa y proteína, respectivamente, en promedio) ni en cambio de peso vivo (+ 16 kg de peso vivo, en promedio) (Cuadro 5).

Cuadro 5. Efecto del tipo de pastura en la producción y composición de la leche, y cambio del peso vivo (kg) de las vacas

	Pasturas		
	L	G	P
Producción de leche (kg/vaca/d)	20,7	19,9	0,7508
Contenido de grasa (g/kg)	37,7	36,5	0,5030
Rendimiento de grasa (g/d)	772	711	0,3630
Contenido de proteína (g/kg)	34,0	32,5	0,1068
Rendimiento de proteína (g/d)	699	636	0,3728
Leche corregida por grasa (LCG) ¹ (kg/d)	19,9	18,7	0,5173
Cambio de peso vivo (kg)	+12	+20	0,2317

¹ LCG: Leche corregida al 4% de grasa (LCG (kg/d)=0,4*leche (kg/d) + (15* kg de grasa/d))

3.4. EMISIÓN DE METANO EN VACAS LECHERAS EN PASTOREO

La emisión diaria de CH₄ fue similar entre los tratamientos, con un promedio de emisión por animal de 368 g/d. Así mismo, la emisión de CH₄ expresada por unidad de producción de leche fue 18,9 g/kg (19,6 g/kg LCG 4%) y no difirió entre tratamientos (Cuadro 6). Del mismo modo, la producción de CH₄ por unidad de consumo de MS (22,2 g/kg, en promedio), como porcentaje de energía bruta ingerida (Y_m) (6,6%, en promedio), o por unidad de FDN ingerida (47,8 g/kg, en promedio) no difirió entre tratamientos (pasturas L y G) (Cuadro 6).

Cuadro 6. Efecto de las pasturas sobre la emisión de metano entérico expresada como emisión absoluta diaria, o como rendimiento por unidad de consumo o por producción de leche

	Pasturas		
	L	G	P
Producción de metano			
(g/vaca/d)	364	372	0,7237
(g/kg leche)	18,3	19,6	0,3202
(g/kg LCG 4%)	18,6	20,6	0,3517
Rendimiento de metano			
g/kg MS consumida	21,6	22,7	0,5821
g/kg FDN consumida	47,5	48,0	0,9271
Ym	6,4	6,7	0,5971

4. DISCUSION

La producción lechera en Uruguay se basa en el uso de pasturas mezcla de gramíneas y leguminosas. Las leguminosas presentan ventajas respecto a las gramíneas ya que, la fijación biológica de nitrógeno le da ventajas a la propia planta para desarrollarse mejor y tiene un valor nutritivo mayor que las gramíneas, permitiendo un mayor consumo animal, lo cual repercute en la productividad total. Varios autores reportan además la ventaja adicional de un rendimiento de CH₄ por unidad de consumo (g CH₄/kg MSI) menor. Por consiguiente, pasturas ricas en leguminosas por estar asociadas a mayores producciones animales conducen a menores emisiones de CH₄ por unidad de producto. En este sentido, varios son los trabajos que mencionan la incorporación de leguminosas forrajeras como estrategia de mitigación de la emisión de CH₄ entérico (Knight *et al.* 2008, Vlaming 2008, Lee *et al.* 2004). Este trabajo constituye uno de los primeros aportes para generar información nacional sobre las emisiones de CH₄ entérico en vacas lecheras en pastoreo, comparando una pastura rica en leguminosas (60% del total de MS) y otra pastura rica en gramíneas (76% del total de MS).

4.1. CALIDAD DEL FORRAJE OFRECIDO

Las pasturas experimentales presentaron diferente composición química. La pastura G presentó mayor contenido de paredes celulares (FDN, FDA) y menor contenido de PB que la pastura L. Ambas pasturas se encontraban en estado reproductivo, pero ello afectó más la calidad del raigrás que de las leguminosas, como se puede comprobar a partir de los datos de la prueba de digestibilidad con ovinos. El cambio del estadio vegetativo al estadio reproductivo en las gramíneas en la primavera significa un aumento de la fracción tallo en detrimento de la fracción hoja (Anexo 2) lo cual disminuye la DMO. Adicionalmente, esta disminución es más acentuada en raigrás LE 284 (variedad utilizada en este trabajo) con respecto a otras variedades de floración más tardía (García, 2003).

Con respecto al contenido de TC, la mayor concentración en L respecto a G puede ser atribuida a la presencia de *Trifolium repens*, que según Lassey *et al.* (1997), también posee una concentración de TC en sus flores.

La digestibilidad de la MS de la pastura G ofrecida (determinada en capones), está de acuerdo con los valores reportados por Molano y Clark (2008) para raigrás en estado reproductivo. Dichos valores fueron obtenidos en un experimento para determinar el efecto del nivel y la calidad de consumo de forraje en la producción de CH₄ en capones. Por otro lado, no hay que descartar que la menor DMS obtenida en esta pastura se explique en parte por la menor digestibilidad de la fracción FDN medida en las pruebas con capones, asociado a un menor contenido de PB. Según Poppi y McLennan (1995) existe una relación óptima entre el contenido de PB y de DMO de la pastura para permitir una adecuada celulólisis a nivel ruminal, la cual es de 210 g PB/kg MOD. Tomando como referencia este valor citado por Poppi y McLennan (1995), se calculó el nivel mínimo de proteína que debía contener cada pastura. El cálculo para G resultó en 171 g PB/kg MOD mientras que en L fue de 318 g PB/kg MOD. En este sentido, el valor de PB observado en G estaría por debajo del valor mínimo requerido para una óptima celulólisis, lo cual podría explicar la menor digestibilidad medida en ovinos de esta pastura. Resultados similares fueron observados por Peyraud *et al.* (1997) y Mambrini y Peyraud (1992).

4.2. CONSUMO Y CALIDAD DEL FORRAJE DEFOLIADO (DIETA)

Debido a la alta asignación de forraje por vaca y a la altura residual del forraje remanente post-pastoreo (20 cm) la calidad del forraje defoliado en G fue mayor que la del forraje ofrecido (mayor contenido de PB y EB, pero menor contenido de aFDN_{mo} y FDAmo que el forraje ofrecido, lo cual es congruente con los resultados obtenidos por Delagarde *et al.* (2000), quienes reportan la existencia de un gradiente vertical en relación a la composición química, entre la parte superior y la capa inferior de raigrás. Es de destacar además que el consumo de MO no se vio afectado en la pastura G, donde el raigrás se encontraba en estadio reproductivo temprano, de acuerdo con lo reportado por Astigarraga y Peyraud (1995).

En función de lo mencionado anteriormente, el consumo MO digestible también fue similar (11,2 kg/vaca/d, en promedio) entre L y G. El consumo de energía estimado a partir de este consumo de MOD, está de acuerdo con los requerimientos de mantenimiento, producción de leche y ganancia de peso, calculados a partir del sistema INRA (1989) y ajustado por el gasto de pastoreo (Ribeiro *et al.*, 1977).

4.3. EMISIÓN DE METANO

Antes de discutir los valores de CH₄ obtenidos, no se puede dejar de mencionar que en lo que respecta a la recolección de muestras de aire, la eficiencia de recolección no fue muy alta. De las 68 muestras esperadas (64 sobre animales, y 4 de aire atmosférico), solo el 52 % estuvo en el rango previsto de muestra acumulada (400 mbar y 600 mbar). Esta eficiencia de recolección es baja, respecto de que se han reportado en experimentos con un montaje similar de los equipos. Con animales de similares características, Gere y Gratton (2010) obtuvieron una eficiencia de recolección del 80% y eficiencias más altas fueron obtenidas en un ensayo sobre ovinos en Brasil (90 %) (Acevedo do Amaral, 2011).

Es posible que la baja eficiencia de recolección este asociada al acople de los equipos. En la mayoría de los casos las muestras perdidas se encontraron con presiones cercanas a la atmosférica, lo cual sustenta esta hipótesis. A pesar de la baja eficiencia de recolección, este problema fue compensado casi totalmente por la duplicación de las muestras. Pese a ello, el experimento mostró la notable simplificación que se logra gracias a la recolección extendida sobre 5 días y de hecho fue suficiente una única muestra por animal en cada situación. En el Cuadro 7 se reportan el número de muestras esperado y el número de muestras obtenidos, para los dos tratamientos y para el total de los animales. Se observa que fue posible monitorear la emisión casi en la totalidad de los animales (94 %).

Cuadro 7. Número esperado (número máximo) de muestras y número de muestras obtenidas para los dos tratamientos y para el total de animales.

Pasturas			
	L	G	
<i>Nº Muestras</i>			Total
Esperado	16	16	32
Obtenidas	14	16	30
%	87.5	100	93.8

Los resultados obtenidos de emisión de CH₄ en este trabajo no evidencian diferencias entre pasturas. Estos resultados son atribuidos a que, si bien se logró aportar una pastura con alta proporción de leguminosas en su composición (L=60% de leguminosas), al momento del pastoreo la selección realizada por los animales no permitió que se lograran diferencias entre tratamientos en relación a la composición química del forraje defoliado y que tampoco se observaran diferencias en consumo. Otro aspecto a considerar en relación a la composición química de las pasturas es la presencia de taninos condensados. Se ha reportado en la bibliografía el efecto de estos sobre la reducción de la emisión de CH₄ (Martin *et al.* 2010, Beauchemin *et al.* 2008, Vlaming 2008, Woodward *et al.* 2004), pero los valores obtenidos en las pasturas experimentales se encuentran muy por debajo de los contenidos reportados en la bibliografía con efecto sobre la emisión de CH₄ (27 g/kg MS), por lo cual no es de esperar un efecto de dichos compuestos secundarios sobre la metanogénesis.

Los valores de emisión de metano entérico promedio obtenidos en el marco de este trabajo (368 g/d), coinciden con los reportados por Waghorn *et al.* (2003) y Westberg *et al.* (2001), los cuales están en el rango de 345-388 g CH₄/d para vacas lecheras con similares niveles de consumo y de producción.

En este trabajo, la producción de CH₄ en relación a la MS o al FDN consumido tampoco difirió entre tratamientos (22,15 g CH₄/kg MSI, 47,75 g CH₄/kg FDN, respectivamente). Esto se debe a que, como ya se mencionó, el consumo de ambas fracciones también fue similar entre los tratamientos. Los valores se encuentran en el rango reportado por Hammond *et al.* (2011), Hammond *et al.* (2009), Molano y Clark (2008), Hindrichsen *et al.* (2006), Benchaar *et al.* (2001), Woodward *et al.* (2004) para pasturas de clima templado. Es bien sabido que la composición de la dieta y el consumo son los principales factores que afectan la producción de metano entérico por los rumiantes. En este sentido, Archimède *et al.* (2011) realizaron un metanálisis con los resultados de la bibliografía publicados sobre producción de metano de bovinos consumiendo forrajes, poniendo en evidencia que la mayor parte de la variación en el rendimiento de metano expresado por unidad de consumo, puede ser atribuida a la digestibilidad de la dieta, el contenido de FDN del forraje y el nivel de consumo de los animales. Utilizando la ecuación, ajustada por estos autores ($\text{CH}_4 \text{ (L/kg MSI)} = -4,2 + 39,2 \cdot \text{DMO (kg/kg MO)} + 21,1 \cdot \text{FDN forraje (kg/kg MS)} - 0,15 \cdot \text{MOI (kg)/PV}^{0,9}$ (n=115, R²=0,77; P<0,0001)), se obtiene un valor de 27,4 L/kg MSI, próximo al valor de 30,2 L/kg MSI obtenido en este estudio. Este trabajo muestra además que si se analizan dietas en base a leguminosas o en base a gramíneas templadas, a similar consumo, similar digestibilidad de la dieta y similar contenido de FDN del forraje, éstas no difieren en el rendimiento de metano por unidad de consumo, lo cual concuerda con los resultados reportados en este estudio.

En el presente ensayo, se obtuvo una producción de CH₄ como % de la EB ingerida (Y_m) de 6,5% (en promedio). Los valores de Y_m obtenidos se encuentran en el rango de los valores reportados en Nueva Zelanda por Lassey (2007), Boadi y Wittenberg (2002) en vacas lecheras en pastoreo en forrajes de clima templados y dentro de los valores reportados por el IPCC para el cálculo de las emisiones de CH₄ en los Inventarios Nacionales.

Es de destacar que este es el primer trabajo realizado a nivel nacional con vacas lecheras en pastoreo y los valores de emisión entérica obtenidos se corresponden con los reportados para animales en similares condiciones de producción. Se considera

que este trabajo debería ser complementado con otros que caractericen las pérdidas de energía como CH_4 para vacas lecheras en etapa temprana de producción (ya que en este trabajo las vacas se encontraban en etapa media a tardía), y que incorporen al análisis la evaluación de dietas mixtas de forrajes y concentrados características de los sistemas de producción de leche en el país.

5. CONCLUSIONES

- Los valores promedio de CH₄ se encuentran dentro del rango reportado en la bibliografía internacional para vacas lecheras en pasturas de clima templado. En este sentido, se puede concluir que la técnica de trazado por SF₆ para medición en tiempo prolongado permitió estimar adecuadamente la emisión diaria de CH₄ en animales en pastoreo, aportando una simplificación logística valiosa a nivel de campo.
- La estimación de las emisiones de CH₄ en condiciones de pastoreo requiere tener en cuenta aspectos relacionados el pastoreo selectivo y determinar la calidad del forraje defoliado por los animales en pastoreo. La alta asignación de forraje utilizada en este trabajo permitió que la calidad de la dieta seleccionada por las vacas no difiriera entre una pastura rica en gramíneas y una rica en leguminosas y, en consecuencia, las emisiones de CH₄ expresado por unidad de consumo (MS o MO) fueran similares en ambas pasturas. Estos resultados ponen en evidencia que a similar consumo, las diferencias entre pasturas están más relacionadas con diferencias en la calidad (asociadas a digestibilidad y al contenido de FDN) que con propiedades inherentes a leguminosas o gramíneas templadas.

6. BIBLIOGRAFÍA

- AOAC. 1990. Official Methods of Analysis, 15th ed. Association of Official Analytical Chemists, Virginia, USA. 770-771.
- Archimède H, Eugène M, Magdeleine C, Boval M, Martin C, Morgavi D, Lecomte P, Doreau M. 2011. Comparison of methane production between C3 and C4 grasses and legumes. *Animal Feed Science and Technology*. 166: 59-64.
- Astigarraga L, Peyraud J. 1995. Effects of sward structure upon herbage intake by grazing dairy cows. *Annales de Zootechnie, Special Issue: IVth International Symposium on the Nutrition of Herbivores*. 44: 126.
- Azevedo do Amaral G. 2011. Consumo de forragem e emissão de metano por ovinos em ambientes pastoris. Tesis doctoral. Rio Grande Do Sul, Brasil, Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul. 118 p.
- Bárbaro N, Gere J, Gratton R, Rubio R, Williams K. 2008. First measurements of methane emitted by grazing cattle of the Argentinean beef system. *New Zealand Journal of Agricultural Research*. 51: 209-219.
- Beauchemin K, Kreuzer M, O'Mara F, McAllister T. 2008. Nutritional management for enteric methane abatement: a review. *Australian Journal of Experimental Agriculture*. 48: 21-27.
- Benchaar C, Pomar C, Chiquette J. 2001. Evaluation of dietary strategies to reduce methane production in ruminants: A modelling approach. *Canadian Journal Animal Science*. 81: 563-574.
- Blas C, García Rebollos P, Cambra López M, Torres A. 2008. Contribución de los Rumiantes a las emisiones de gases con efecto invernadero [En línea]. 10 de marzo de 2012. <http://www.produccion-animal.com.ar/sustentabilidad/89-gases.pdf>.
- Blaxter K, Clapperton J. 1965. Prediction of the amount of methane produced by ruminants. *British Journal of Nutrition*. 19: 511-522.
- Boadi D, Wittenberg K. 2002. Methane production from dairy and beef heifers fed forages differing in nutrient density using the sulphur hexafluoride (SF₆) tracer gas technique. *Canadian Journal of Animal Science*. 82: 201-206.

- Cambra-López M, García Rebollar P, Estelles F, Torres A. 2008. Estimación de las emisiones de los rumiantes en España: el factor de conversión de metano. Revisión bibliográfica. Archivos de Zootecnia. 57: 89-101.
- Church D. 1990. Fundamentos de nutrición y alimentación de animales. Ed. Limusa. Zaragoza, España. 438 p.
- Clark H, Kelliher F, Pinares-Patiño C. 2011. Reducing CH₄ Emissions from Grazing Ruminants in New Zealand: Challenges and Opportunities. Asian-Australasian Journal Animal Science. 24: 295-302.
- Comeron E, Peyraud J. 1993. Prediction of herbage digestibility ingested by dairy cows. Revista Argentina de Producción Animal. 13: 23-30.
- Cottle D, Nolan J, Wiedemann S. 2011. Ruminant enteric methane mitigation: a review. Animal Production Science. 51: 491-514.
- Delagarde R, Peyraud J, Delaby L, Faverdin P. 2000. Vertical distribution of biomass, chemical composition and pepsin-cellulase digestibility in a perennial ryegrass sward: interaction with month of year, regrowth age and time of day. Animal Feed Science and Technology. 84: 49-68.
- Dirección Nacional de Medio Ambiente. 2010. Inventario Nacional de Emisiones de Gases de Efecto Invernadero: 2004. Resumen Ejecutivo. Ministerio de Vivienda, Ordenamiento Territorial y Medio Ambiente, Dirección Nacional de Medio Ambiente, Unidad de Cambio Climático [En línea]. 26 de abril de 2012.
<http://www.cambioclimatico.gub.uy/images/documentos/ingei%202004%20re.pdf>.
- FAO. 2011. Informe sobre el hambre en el mundo 2011: los precios de los alimentos permanecen elevados y volátiles [En línea]. 30 de marzo de 2012.
<http://www.fao.org>.
- Forster P, Ramaswamy V, Artaxo P, Berntsen T, Betts R, Fahey D, Haywood J, Lean J, Lowe D, Myhre G, Nganga J, Prinn R, Raga G, Schulz M, Van Dorland R. 2007. Changes in Atmospheric Constituents and in Radiative Forcing. In: Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on

- Climate Change [Solomon S, Qin D, Manning M, Chen Z, Marquis M, Averyt K, Tignor M, and Miller H (Eds.)]. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA. 129-234.
- García J. 2003. Crecimiento y calidad de gramíneas forrajeras en La Estanzuela. La Estanzuela, Colonia: Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria. Serie Técnica 133. 26 p.
- Gere J. 2012. La técnica de trazado por SF₆ para medir emisiones de metano de rumiantes en pastoreo: Desarrollos metodológicos y algunas aplicaciones. Tesis Doctoral. Tandil, Argentina. Facultad de Ciencias Exactas. UNCPBA. 142 p.
- Gere J, Gratton R. 2010. Simple, Low-Cost flow controllers for time averaged atmospheric sampling and other applications. Latin American Applied Research. 40: 377-382.
- Gere J, Manetti M, Argüello G, Gratton R. 2007. Muestreo y análisis de CH₄ y SF₆ en aire con largos períodos de recolección. En: Reunión Anual de Física (92, 2007, Salta). Grinblat F. (Ed.). 327-328.
- Grainger C, Clarke T, McGinn S, Auldism M, Beauchemin K, Hannah M, Waghorn G, Clark H, Eckard R. 2007. Methane Emissions from Dairy Cows Measured Using the Sulfur Hexafluoride (SF₆) Tracer and Chamber Techniques. Journal of Dairy Science. 90: 2755-2766.
- Hammond K, Hoskin S, Burke J, Waghorn G, Koolgaard J, Muetzel S. 2011. Effects of feeding fresh white clover (*Trifolium repens*) or perennial ryegrass (*Lolium perenne*) on enteric methane emissions from sheep. Animal Feed Science and Technology. 166: 398-404.
- Hammond K, Muetzel S, Waghorn G, Pinares-Patiño C, Burke J, Hoskin S. 2009. The variation in methane emissions from sheep and cattle is not explained by the chemical composition of ryegrass. Proceedings New Zealand Society of Animal Production. 69: 174-178.
- Harper L, Denmead O, Freney J, Byers F. 1999. Direct measurements of methane emissions from grazing and feedlot cattle. Journal of Animal Science. 77: 1392-1401.

- Hart K, Martin P, Foley P, Kenny D, Boland T. 2009. Effect of sward dry matter digestibility on methane production, ruminal fermentation and microbial populations of zero-grazed beef cattle [En línea]. 12 de febrero de 2012. <http://jas.fass.org/content/early/2009/06/19/jas.2009-1786>.
- Hindrichsen I, Wettstein H, Machmuller A, Kreuzer M. 2006. Methane emission, nutrient degradation and nitrogen turnover in dairy cows and their slurry at different milk production scenarios with and without concentrate supplementation. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 113: 150-161.
- INRA. 1989. Ruminant Nutrition: Recommended Allowances and Feed Tables. Paris. Jarrige R (Ed.). 373 p.
- IPCC. 2007. Summary for Policymakers. In: *Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* [Solomon S, Qin D, Manning M, Chen Z, Marquis M, Averyt K, Tignor M, Miller H. (Eds.)]. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA [En línea]. 10 de marzo de 2012. http://www.ipcc.ch/publications_and_data/publications_ipcc_fourth_assessment_report_wg1_report_the_physical_science_basis.htm.
- IPCC. 2001. The scientific basis. Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge University Press. 881 p.
- IPCC. 1996. Guías para presentación de inventarios nacionales. Volumen 4: Agricultura, forestación y cambio en el uso de la tierra [En línea]. 16 de marzo de 2012. <http://www.ipcc-nggip.iges.or.jp/public/2006gl/vol4.htm>.
- Johnson K, Westberg H, Michal J, Cossalman M. 2007. The SF₆ tracer technique: methane measurement from ruminants. In: *Measuring Methane Production from Ruminants*. Makkar H, Vercoe P (Eds.) [En línea]. 16 de marzo de 2012. <http://www.ansci.wsu.edu/People/johnson/Documents/SF6Technique.pdf>.
- Johnson K, Johnson D. 1995. Methane emissions from cattle. *Journal Animal Science*. 73: 2483-2492.

- Johnson K, Huyler M, Westberg H, Lambar B, Zimmerman P. 1994. Measurement of methane emissions from ruminant livestock using a SF₆ tracer technique. *Environmental Science and Technology*. 28: 359-362.
- Kasuya H, Takahashi J. 2010. Methane emissions from dairy cows fed grass or legume silage. *Asian-Australasian Journal Animal Science*. 23: 563-566.
- Klein C, Pinares-Patiño C, Waghorn G. 2008. Greenhouse Gas Emissions. En: McDowell R ed. *Environmental impacts of pasture-based farming*. Mosgiel, New Zealand. 1-9.
- Knight T, Molano G, Clark H, Cavanagh A. 2008. Methane emissions from weaned lambs measured at 13, 17, 25 and 35 weeks of age compared with mature ewes consuming a fresh forage diet. *Australian Journal of Experimental Agriculture*. 48: 240–243.
- Krishnan, S. 2008. The Carbon Trust: Product Carbon Footprinting & Labelling [En línea]. 16 de mayo de 2012. http://www.sustainablefoodtrade.org/publicationsPress/Presentations/ExpoW est09_EcoLabels_Kirshnan.pdf.
- Lassey K, Pinares-Patiño C, Martin R, Molano G, McMillan A. 2011. Enteric methane emission rates determined by the SF₆ tracer technique: Temporal patterns and averaging periods. *Animal Feed and Science Technology*. 166: 183-191.
- Lassey K. 2007. Livestock methane emission: From the individual grazing animal through national inventories to the global methane cycle. *Agricultural and Forest Meteorology*. 142: 120-132.
- Lassey K, Ulyatt M. 1999. Methane emission by grazing livestock, a synopsis of 1000 direct measurements. In: *Non-CO₂ greenhouse gases: scientific understanding, control and implementation*. Van Ham J, Baede A, Meyer L, Ybema R (Eds.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. 101-106.
- Lassey K, Ulyatt M, Martin R, Walker C, Shelton I. 1997. Methane emissions measured directly from grazing livestock in New Zealand. *Atmospheric Environment*. 31: 2905-2914.

- Lee J, Woodward S, Waghorn G, Clark D. 2004. Methane emissions by dairy cows fed increasing proportions of white clover (*Trifolium repens*) in pasture. Proceedings New Zealand Society of Animal Production. 66: 151-155.
- Lelieveld, J, Crutzen P, Dentener F. 1998. Changing concentration, lifetime and climate forcing of atmospheric methane. Tellus. 50: 128-150.
- Littel R, Pendergast J, Natarajan R. 2000. Modelling covariance structure in the analysis of repeated measures data. Statistics in Medicine. 19: 1793-1819.
- López S, Newbold J. 2007. Analysis of Methane. In: Makkar H, Vercoe P. (Eds.). Measuring Methane Production from Ruminants. Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture. International Atomic Energy Agency, Vienna, Austria. 1-12.
- Lorenzen T, Anderson V. 1993. Design of Experiments: a No-name Approach. Dekker M. (Ed.). New York, United States. 414 p.
- Lovett D, Lovell S, Stack L, Callan J, Finlay M, Conolly J, O'Mara F. 2003. Effect of forage/concentrate ratio and dietary coconut oil level on methane output and performance of finishing beef heifers. Livestock Production Science. 84: 135-146.
- Makkar H, Vercoe P. 2007. Measuring Methane Production from Ruminants. Joint FAO/IAEA. Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture. International Atomic Energy Agency, Vienna, Austria. 135 p.
- Mambrini M, Peyraud J. 1992. Passage rate of liquid and particles in the digestive tract of dairy cows fed fresh forage [En línea]. 10 de marzo de 2012. http://animres.edpsciences.org/index.php?option=com_article&access=standard&Itemid=129&url=/articles/animres/abs/1992/01/Ann.Zootech._0003424X_1992_41_1_ART0027/Ann.Zootech._0003424X_1992_41_1_ART0027.html.
- Martin C, Morgavi D, Doreau M. 2010. Methane mitigation in ruminants: from microbe to the farm scale. Animal. 4: 351-365.
- Martin C, Doreau, Morgavi D. 2008. Methane mitigation in ruminants: from rumen microbes to the animal [En línea]. 5 de marzo de 2012.

http://www.animalbytes.org/wpcontent/uploads/2009/06/edition_2_lgccmartin.pdf.

- McCaughey W, Wittenberg K, Corrigan D. 1999. Impact of pasture type on methane production by lactating beef cows. *Canadian Journal of Animal Science*. 79, 221-226.
- McDonald P, Edwards R, Greenhalgh J, Morgan C. 1995. *Animal Nutrition*. Singapore: Longman. 607 p.
- McGinn S, Beauchemin K, Iwaasa A, McAllister T. 2006. Assessment of the sulphur hexafluoride (SF₆) tracer technique for measuring enteric methane emissions from cattle. *Journal of Environmental Quality*. 35: 1686-1691.
- Mertens D. 1997. Creating a system of meeting the fiber requirements of dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 80: 1463-1481.
- Mieres J, Olivera L, Martino D, La Manna A, Fernandez E, Palermo R, Gremminger H. 2003. Methane emission from Holstein heifers grazing contrasting pastures in Uruguay [En línea]. 18 de mayo de 2012. http://www.inia.org.uy/disciplinas/agroclima/publicaciones/ambiente/methane_uruguay.pdf
- Molano G, Clark H. 2008. The effect of level of intake and forage quality on methane production by sheep. *Australian Journal of Experimental Agriculture*. 48: 219-222.
- Moss A, Jouany J, Newbold C. 2000. Methane production by ruminants: its contribution to global warming. *Annales de Zootechnie*. 43: 231-253.
- Murray R, Bryant A, Leng R. 1976. Rates of production of methane in the rumen and large intestine of sheep. *British Journal of Nutrition*. 36: 1-14.
- ONU. 1998. Protocolo de Kioto de la Convención Marco de las Naciones Unidas sobre el Cambio Climático [En línea]. 14 de mayo de 2012. <http://unfccc.int/resource/docs/convkp/kpspan.pdf>.
- ONU. 1992. Convención Marco de las Naciones Unidas sobre el Cambio Climático [En línea]. 14 de mayo de 2012. <http://unfccc.int/resource/docs/convkp/convsp.pdf>.

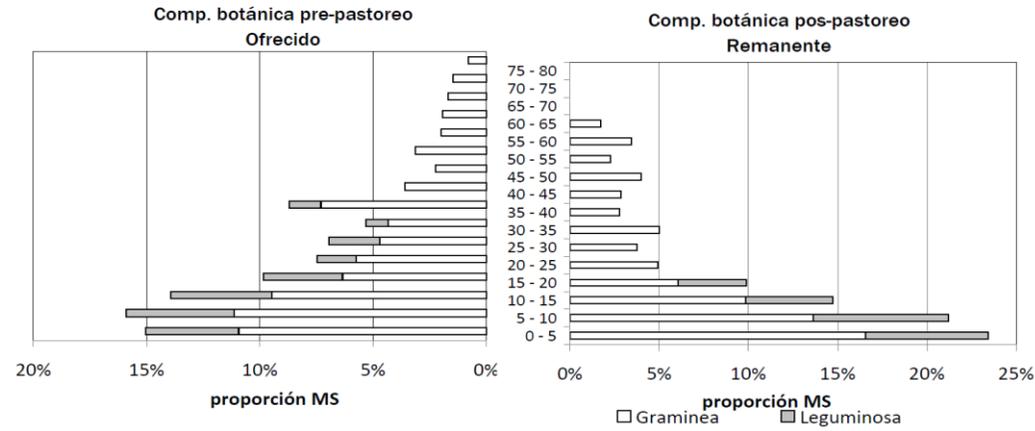
- Peyraud J, Astigarraga L, Faverdin P. 1997. Digestion of fresh perennial ryegrass fertilized at two levels of nitrogen by lactating dairy cows. *Animal Feed Science and Technology*. 64: 155-171.
- Peyraud J, Comeron E, Wade M, Lemaire G. 1996. The effect of daily herbage allowance, herbage mass and animal factors upon herbage intake by grazing dairy cows. *Annales de Zootechnie*. 45: 201-217.
- Pinares-Patiño C, Gere J, Williams K, Gratton R, Juliarena P, Molano G, MacLean S, Sandoval E, Taylor G, Koolaard J. 2012. Extending the Collection Length of Breath Samples for Enteric Methane Emission Estimation Using the SF₆ Tracer Technique. *Animals*. 2 (2): 275-287.
- Pinares-Patiño C, Lassey K, Martin R, Molano G, Fernandez M, MacLean S, Sandoval E, Luo D, Clark H. 2011. Assessment of the sulphur hexafluoride (SF₆) tracer technique using respiration chambers for estimation of methane emissions from sheep. *Animal Feed and Science Technology*. 166: 201-209.
- Pinares-Patiño C, Hour P, Jouany J, Martin C. 2007. Effects of stocking rate on methane and carbon dioxide emissions from grazing cattle. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 121: 30-46.
- Pinares-Patiño C, Ulyatt M, Lassey K, Barry T, Holmes C. 2003a. Rumen function and digestion parameters associated with differences between sheep in methane emissions when fed chaffed lucerne hay. *Journal of Agricultural Science*. 140: 205-214.
- Pinares-Patiño C, Baumont R, Martin C. 2003b. Methane emissions by Charolais cows grazing a monospecific pasture of timothy at four stages of maturity. *Canadian Journal of Animal Science*. 83: 769-776.
- Poppi D, McLennan S. 1995. Protein and Energy utilization by ruminants at pasture. *Journal of Animal Science*. 73: 278-290.
- Primavesi O, Frighetto R, Pedreira M, Lima M, Berchielli T, Demarchi J, Manella M, Barbosa M, Johnson K, Westberg H. 2004. Técnica do gás traçador SF₆ para medição de campo do metano ruminal em bovinos: adaptações para o Brasil. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste. 76 p.

- Ramírez-Restrepo C, Barry T. 2005. Alternative temperate forages containing secondary compounds for improving sustainable productivity in grazing ruminants. *Animal Feed Science and Technology*. 120: 179–201.
- Ribeiro J, Brockway J, Webster A. 1977. A note on the energy cost of walking in cattle. *Animal Production*. 25: 107–110.
- Robertson L, Waghorn G. 2002. Dairy industry perspectives on CH₄ emissions and production from cattle fed pasture or total mixed rations in New Zealand. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production* 62: 213-218.
- SAS Institute. Inc. 2001. SAS User's guide. 8 ed. SAS Cary, NC: SAS Institute.
- Schofield P, Mbugua D, Pell A. 2001. Analysis of condensed tannins: a review. *Animal Feed Science and Technology*. 91:21-40.
- Ulyatt M, Lassey K, Shelton I, Walker C. 2002. Seasonal variation in methane emission from dairy cows and breeding ewes grazing ryegrass/white clover pasture in New Zealand. *New Zealand Journal of Agricultural Research*. 45: 217-226.
- Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires. 2006. Actividades Habilitantes para la 2º Comunicación Nacional del Gobierno de la República Argentina a las partes de la Convención Marco de las Naciones Unidas sobre Cambio Climático: Mitigación de Emisiones a través de la Reducción de las Emisiones de Metano Entérico [En línea]. 10 de enero de 2012. http://aplicaciones.medioambiente.gov.ar/archivos/web/UCC/File/comunicaciones_nacionales/metano_enterico_final.pdf.
- Van Soest P, Robertson J, Lewis B. 1991. Methods for dietary fibre, neutral detergent fibre and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal Dairy Science*. 74: 3583-3597.
- Varga G, Kolver E. 1997. Microbial and animal limitations to fibre digestion and utilization. *Journal of Nutrition*. 127: 819-823.
- Vermorel M. 1995. Emissions annuelles de méthane d'origine digestive par les bovins en France. Variations selon le type d'animal et le niveau de production. *INRA Productions Animales*. 8: 265-272.

- Vlaming J. 2008. Quantifying variation in estimated methane emission from ruminants using the SF₆ tracer technique. Thesis Doctoral. Palmerston North, New Zealand, Massey University. 186 p.
- Waghorn G, Woodward S. 2006. Ruminant contributions to methane and global warming – New Zealand perspective. In: Bhatti J, Lal R, Apps M, Price M. (Eds.). Climate Change and Managed Ecosystems. CRC Taylor and Francis, Boca Raton, FL, USA. 233-260.
- Waghorn G, Molano G, Cavanagh A. 2003. An Estimate of Whole Herd Methane Production from Cows at the Lincoln University Dairy Farm in October 2003. A report prepared for Landcare Research, New Zealand. 23 p.
- Waghorn G, Tavendale M, Woodfield D. 2002. Methanogenesis from forages fed to sheep. Proceedings of the New Zealand Grassland Association. 64: 167-171.
- Westberg H, Lamb B, Johnson K, Huyler M. 2001. Inventory of methane emissions from U.S. cattle. Journal of Geophysical Research. 106: 12633-12642.
- William C, David D, Lismoa O. 1962. The determination of chromic oxide in fecal samples by atomic absorption spectrophotometry. Journal Agricultural Science. 59: 381-385.
- Williams Y, Walker G, Doyle P, Egan A, Stockdale C. 2005. Rumen fermentation characteristics of dairy cows grazing different allowances of Persian clover- or perennial ryegrass-dominant swards in spring. Australian Journal of Experimental Agriculture. 45: 665-675.
- Woodward S, Waghorn G, Laboyrie P. 2004. Condensed tannins in birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus*) reduce methane emissions from dairy cows. Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production. 64: 160-164.

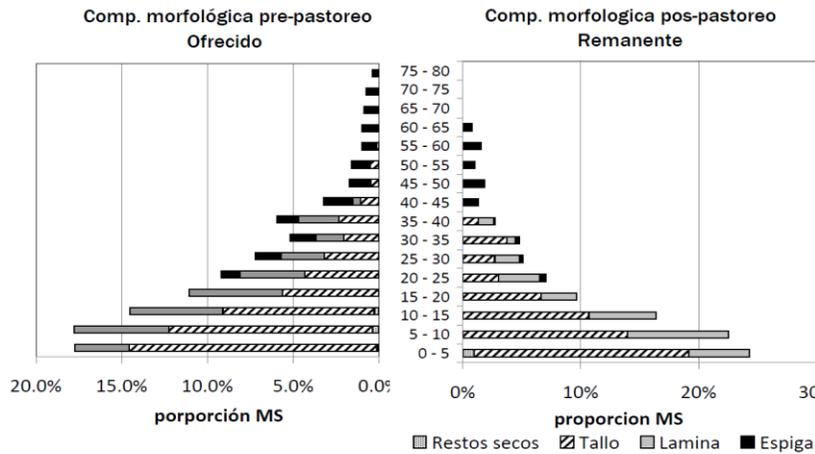
7.2. ANEXO 2

Pastura de raigras y lotus (tratamiento G) en PERIODO 1 - Composición botánica y composición morfológica -



Gramínea

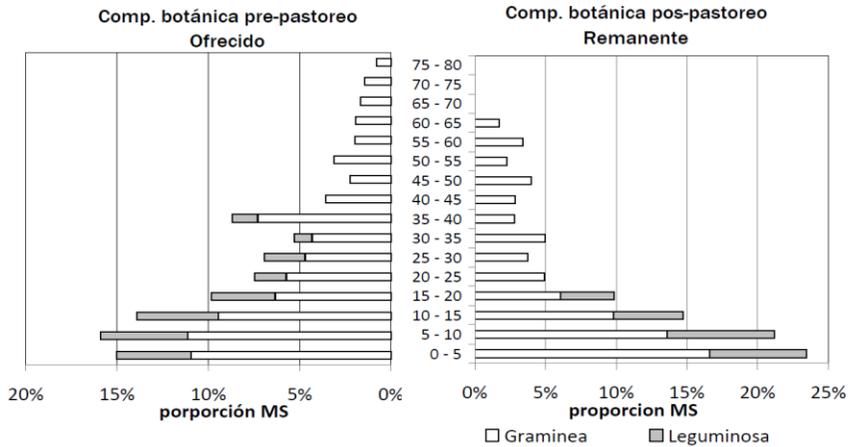
Leguminosa



Gramínea (Raigras)

Composicion morfológica (%MS peso total de raigras)

LAMINA	TALLO	ESPIGA	R.SECOS
30.5%	54.8%	13.2%	0.8%

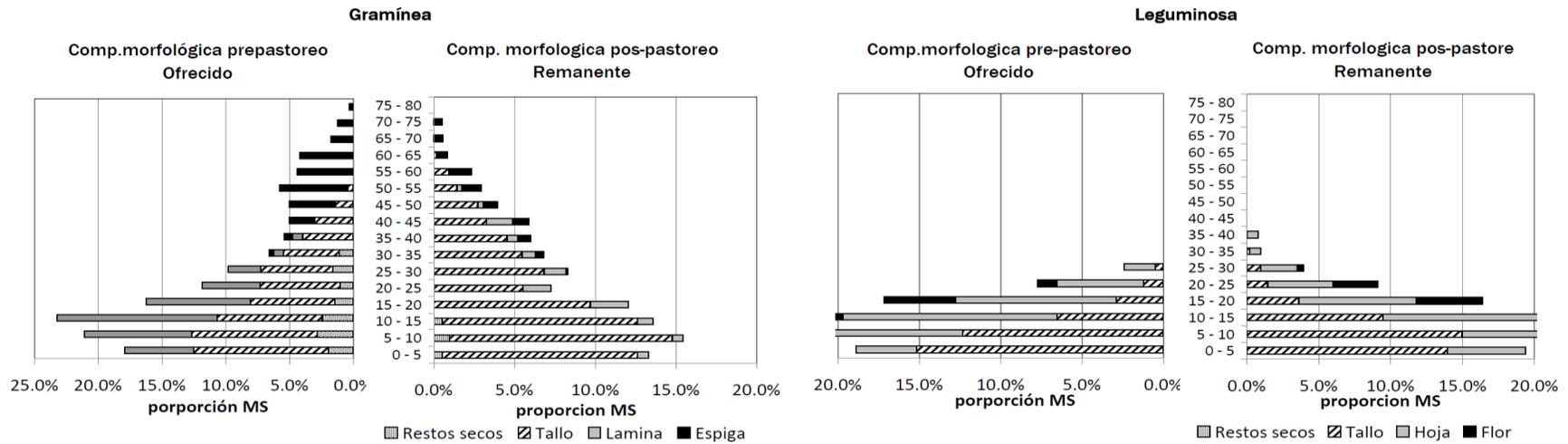
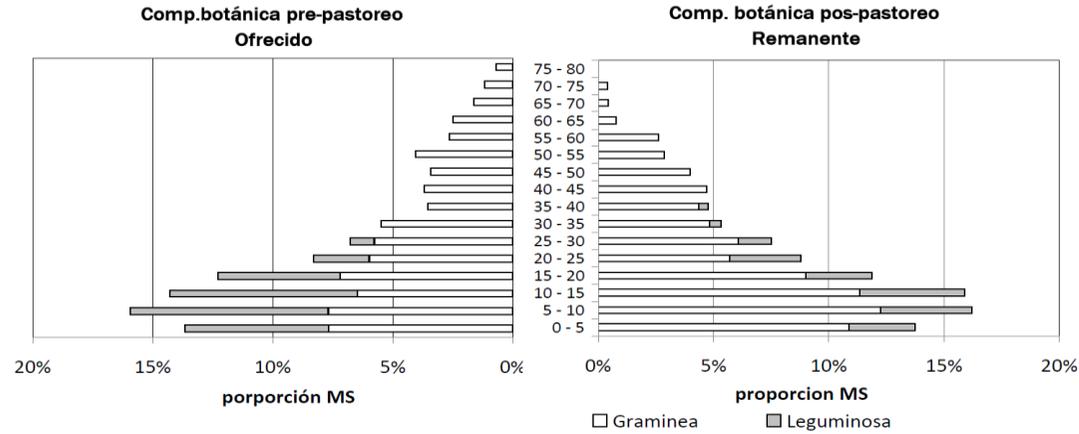


Leguminosa (Lotus)

Composicion morfológica (%MS peso total de lotus)

HOJA	TALLO	FLOR	R.SECOS
60.6%	36.6%	2.8%	0.0%

Pastura de raigras y lotus (tratamiento G) en PERIODO 2 - Composición botánica y composición morfológica -



Gramínea (Raigras)

Composición morfológica (%MS peso total de raigras)

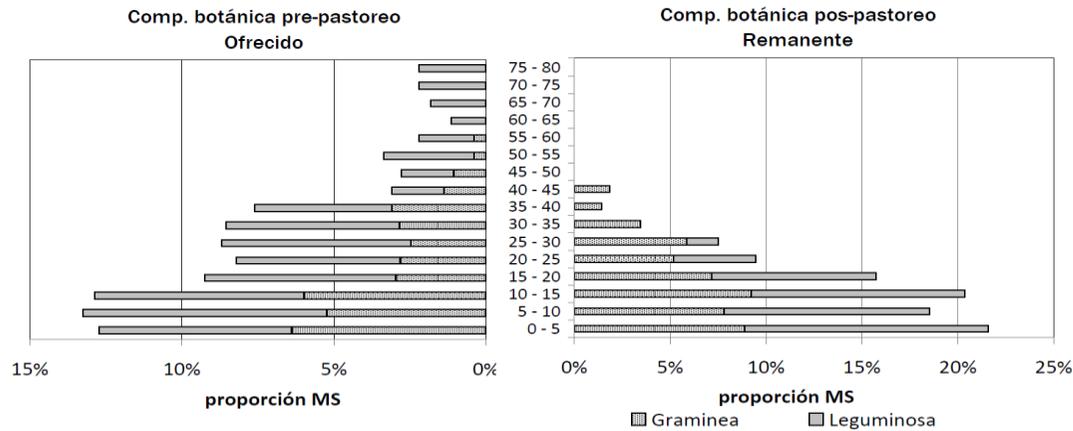
LAMINA	TALLO	ESPIGA	R.SECOS
3.4%	60.4%	23.9%	12.3%

Leguminosa (Lotus)

Composición morfológica (%MS peso total de lotus)

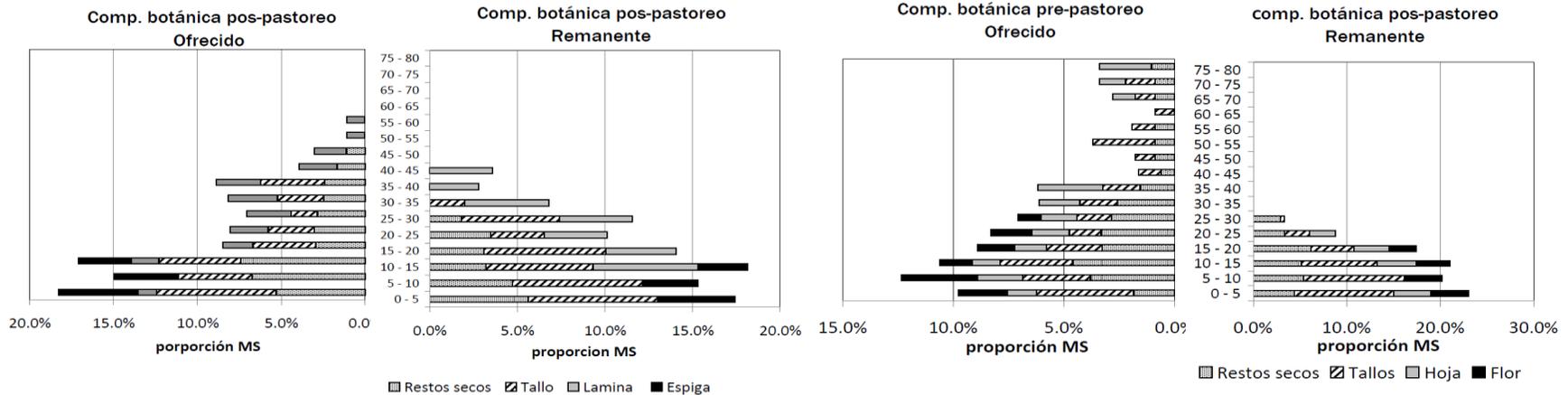
HOJA	TALLO	FLOR	R.SECOS
45.7%	38.6%	10.4%	4.5%

Pastura de alfalfa, t.blanco y cebadilla (tratamiento L) en PERIODO 1 - Composición botánica y composición morfológica -



Gramínea

Leguminosas



Gramínea (Cebadilla)

Composición morfológica (%MS peso total de cebadilla)

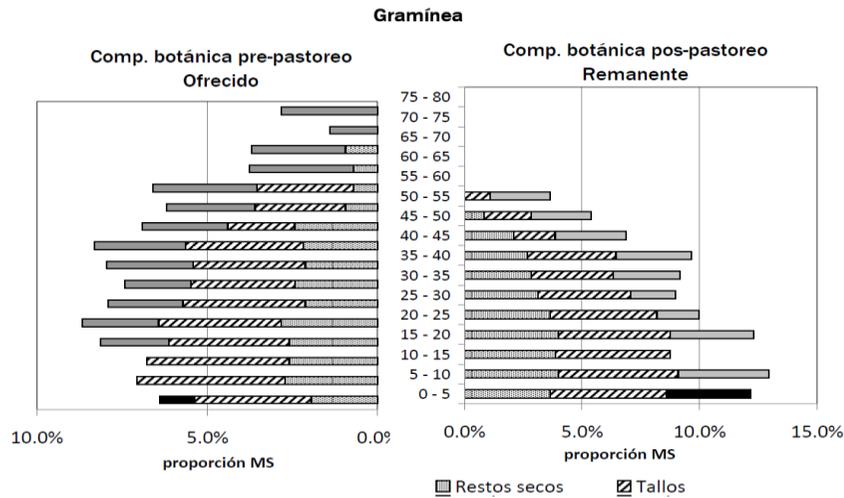
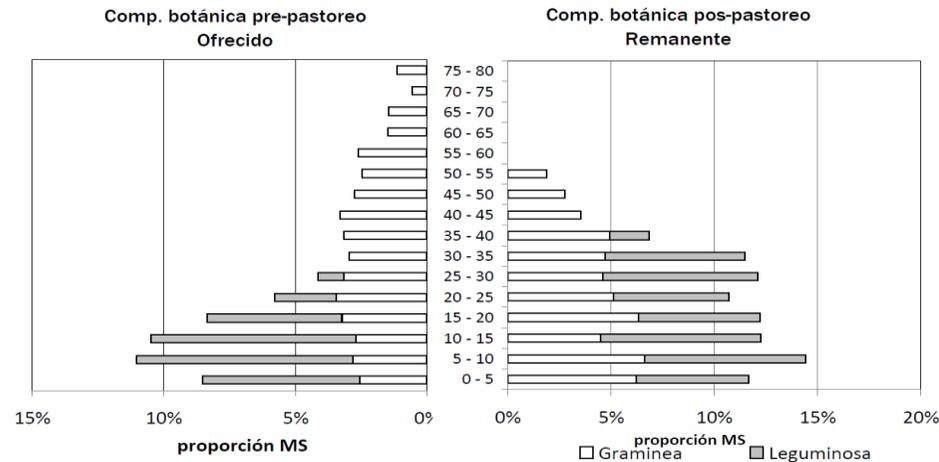
LAMINA	TALLO	ESPIGA	R.SECOS
35.8%	31.0%	21.4%	11.8%

Leguminosas (Alfalfa y Trebol blanco)

Composición morfológica (%MS peso total de alfalfa y t. blanco)

HOJA	TALLO	FLOR	R.SECOS
29.9%	28.5%	18.8%	11.7%

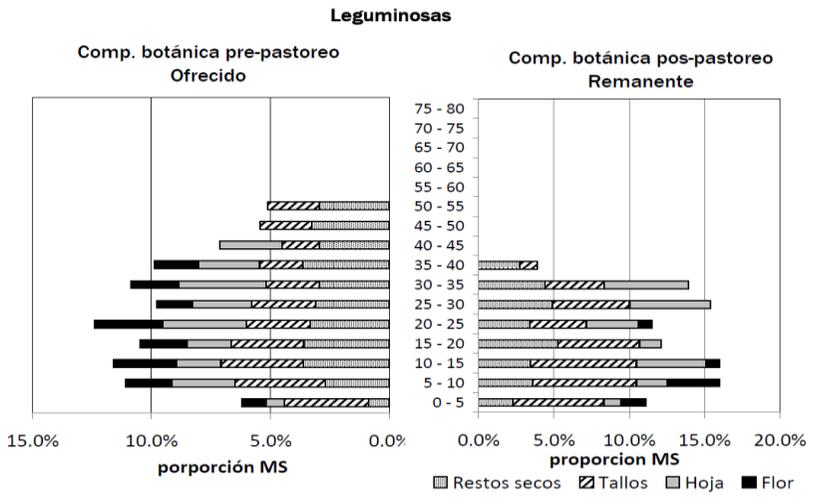
Pastura de alfalfa, t.blanco y cebadilla (tratamiento L) en PERIODO 2 - Composición botánica y composición morfológica -



Gramínea (Cebadilla)

Composición morfológica (%MS peso total de cebadilla)

LAMINA	TALLO	ESPIGA	R.SECOS
27.2%	39.9%	31.8%	1.0%



Leguminosas (Alfalfa y Trébol blanco)

Composición morfológica (%MS peso total de alfalfa y t. blanco)

HOJA	TALLO	FLOR	R.SECOS
33.0%	29.1%	22.0%	15.9%