

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA  
FACULTAD DE AGRONOMÍA**

**CONSUMO, GASTO ENERGÉTICO Y EMISIONES DE  
METANO DE VACAS LECHERAS PASTOREANDO A  
DIFERENTES BIOMASAS**

**por**

**Cecilia LOZA ACOSTA**

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

MONTEVIDEO  
URUGUAY  
Noviembre 2017

Tesis aprobada por el tribunal integrado por Ing. Agr. (PhD) Virginia Beretta, Ing. Agr. (PhD) Mariana Carriquiry e Ing. Agr. (PhD) Alejandro La Manna, el 13 de diciembre de 2017. Autora: Ing. Agr. Cecilia Loza. Directora: Ing. Agr. (PhD) Laura Astigarraga.

Dedico este trabajo a mi familia, por su comprensión y su apoyo incondicional.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Equipo de Físico Química Ambiental de la Facultad de Ciencias Exactas (Tandil, Argentina), y muy especialmente al Dr. José Gere, por su buena disposición y colaboración continua.

A Cristina Cabrera y Amabelia del Pino por facilitar sus laboratorios para el procesamiento de muestras. Al personal del laboratorio de Nutrición Animal de la Facultad de Agronomía, especialmente Gabriela Arias y Shirley Furtado, por su colaboración y su paciencia.

A Paco Casal por su colaboración en la etapa de campo y su apoyo posterior.

A Sergio Díaz, Luciana Acosta, Camila Diaz, Carla García por su colaboración en la etapa de campo.

A los funcionarios de la unidad de lechería de la EEBR por su colaboración.

A Soledad Orcasberro y Carlos Mantero, por su preocupación y sus aportes constantes, su apoyo incondicional y su amistad.

A Laura Astigarraga, por guiarme y formarme constantemente a lo largo de este proceso.

A mis afectos, por su presencia incondicional, y a todos los que, de alguna forma u otra, se hicieron presentes.

## TABLA DE CONTENIDO

	Página
<b>PÁGINA DE APROBACIÓN .....</b>	<b>II</b>
<b>AGRADECIMIENTOS... ..</b>	<b>VI</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>VII</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>VIII</b>
<b>1. <u>INTRODUCCIÓN</u> .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1.1. <u>Efecto de la biomasa pre-pastoreo sobre consumo en</u></b> <b><u>pastoreo</u>.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1.2. <u>Efecto de la biomasa pre-pastoreo sobre el gasto energético de</u></b> <b><u>vacas en pastoreo</u> .....</b>	<b>5</b>
<b>1.1.3. <u>Efecto de la biomasa pre-pastoreo sobre la emisión de metano de</u></b> <b><u>vacas en pastoreo</u>.....</b>	<b>9</b>
<b>1.2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....</b>	<b>11</b>
<b>1.2.1. <u>Hipótesis</u> .....</b>	<b>11</b>
<b>1.2.2. <u>Objetivo general</u>.....</b>	<b>11</b>
<b>1.2.3. <u>Objetivos específicos</u> .....</b>	<b>11</b>
<b>2. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u> .....</b>	<b>12</b>
<b>2.1. PREPARACIÓN DE LA PASTURA PARA LA DETERMINACIÓN</b> <b>DE LOS TRATAMIENTOS .....</b>	<b>12</b>
<b>2.2. MEDICIONES EN LAS PASTURAS .....</b>	<b>13</b>
<b>2.2.1. <u>Disponibilidad y altura</u> .....</b>	<b>13</b>
<b>2.2.2. <u>Composición botánica y morfológica</u> .....</b>	<b>13</b>
<b>2.3. MEDICIONES EN LOS ANIMALES .....</b>	<b>14</b>
<b>2.3.1. <u>Consumo</u> .....</b>	<b>14</b>
<b>2.3.2. <u>Comportamiento en pastoreo</u> .....</b>	<b>15</b>
<b>2.3.3. <u>Producción individual y composición de la leche</u> .....</b>	<b>15</b>
<b>2.3.4. <u>Peso vivo</u> .....</b>	<b>15</b>

2.3.5. <u>Emisiones de CH<sub>4</sub></u> .....	15
2.3.6. <u>Partición de energía y gasto energético</u> .....	16
2.4. ANÁLISIS QUÍMICOS .....	18
2.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	20
3. <u>RESULTADOS</u> .....	22
3.1. CARACTERIZACIÓN AGROCLIMÁTICA DE LA ZONA .....	22
3.2. CARACTERÍSTICAS DE LA PASTURA .....	22
3.2.1. <u>Biomasa pre-pastoreo</u> .....	22
3.2.2. <u>Forraje desaparecido</u> .....	24
3.3. CONSUMO, COMPORTAMIENTO EN PASTOREO Y PRODUCCIÓN.....	27
3.3.1. <u>Producción de heces, digestibilidad y consumo</u> .....	27
3.3.2. <u>Comportamiento</u> .....	27
3.3.3. <u>Producción, composición de leche y variación de peso vivo</u> .....	28
3.4. EMISIONES DE METANO .....	29
3.5. GASTO ENERGÉTICO .....	29
4. <u>DISCUSIÓN</u> .....	33
5. <u>CONCLUSIONES</u> .....	41
6. <u>BIBLIOGRAFÍA</u> .....	42
7. <u>ANEXOS</u> .....	50
7.1. ANEXO 1. Artículo: Effect of herbage biomass on intake, energy expenditure and methane emissions of dairy cows grazing at different biomass.....	50

## RESUMEN

Los rumiantes han sido cuestionados por su contribución al cambio climático debido a las emisiones de metano (CH<sub>4</sub>) entérico. En sistemas pastoriles, la eficiencia de producción depende en gran medida del uso de las pasturas. En pasturas de baja biomasa, el gasto energético (HP) extra por actividad podría alcanzar el 25 a 30%, debido al pastoreo, lo que debería resultar en un incremento de las emisiones de CH<sub>4</sub> por litro de leche producida y en la Huella de Carbono (HC). Para Uruguay, con sistemas de producción lechera basados en pasturas, es importante ajustar prácticas de manejo del pastoreo más eficientes que puedan conducir a un aumento en la producción de leche y a una reducción de la HC. El objetivo de este trabajo fue cuantificar el efecto de la biomasa, sobre el HP, las emisiones diarias de CH<sub>4</sub> y la producción individual (LCGP) de vacas lecheras en pastoreo. Los tratamientos consistieron en dos biomasa (BAJA vs. ALTA) de una pastura a base de *Dactylis glomerata* y *Medicago sativa* con una asignación de forraje de 30 kg MS a<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> sobre 5 cm, con un diseño de Cuadrado Latino Replicado 2 × 2, con 8 vacas Holando, en dos períodos de medición. El consumo individual de MS (MSI) se estimó usando óxido de cromo y la digestibilidad fue estimada mediante indicadores fecales (N y FDA). El tiempo de pastoreo se determinó mediante observación, entre ordeños (9 h). GE fue estimado mediante tasa cardíaca y pulso de O<sub>2</sub>, las emisiones de metano se determinaron utilizando la técnica de trazado por hexafluoruro de azufre. La producción individual y composición de la leche se midieron a diario. La altura pre-pastoreo y la biomasa encima de 5cm fueron diferentes (48 vs. 37 cm,  $P = 0,0374$ ; 1859 vs. 1447 kg MS ha<sup>-1</sup>;  $P = 0,0500$ , respectivamente). Sin embargo, MSI (18,3 kg d<sup>-1</sup>;  $P = 0,5101$ ), tiempo de pastoreo (324 min;  $P = 0,6392$ ), y HP (746 kJ kg PM<sup>-1</sup>,  $P = 0,5524$ ) no difirieron entre tratamientos, por lo tanto, LCGP y rendimiento de CH<sub>4</sub> también fueron similares (20,6 kg d<sup>-1</sup>,  $P = 0,7527$ ; 21 g kg MS<sup>-1</sup>,  $P = 0,7115$ , respectivamente). En el presente estudio, la biomasa en BAJA fue mayor de lo buscado, lo que explicaría la ausencia de diferencias en el consumo y el gasto energético, y por lo tanto en la producción de leche y las emisiones de metano entre tratamientos.

**Palabras clave:** lechería, biomasa, consumo, gasto energético, emisiones de metano

## SUMMARY

### INTAKE, ENERGY EXPENDITURE AND METHANE EMISSIONS OF DAIRY COWS GRAZING AT DIFFERENT BIOMASS

Ruminants have been questioned for their contribution to climate change due to enteric methane emissions. In grazing systems, production efficiency highly depends on the use of pastures. In low biomass pastures, the extra energy expenditure (HP) per activity could reach 25 to 30% due to grazing, which should result in an increase in methane emissions per liter of milk produced and Carbon footprint (CF). For Uruguay, with predominant pasture based dairy systems, it is important to adjust management practices that lead to an increase in milk production and therefore, a reduction of CF. The aim of this work was to quantify the effect of biomass on EE, daily methane emissions (CH<sub>4</sub>) and fat and individual milk yield (FPCM) of grazing dairy cows. Treatments consisted of two pre-grazing biomass (LHM vs. HHM) of a *Dactylis glomerata* and *Medicago sativa* based pasture, at a daily herbage allowance of 30 kg DM above 5 cm, with a 2 × 2 Replicated Latin Square design, with eight Holstein dairy cows, in two measurement periods. Daily individual DM intake (DMI) was estimated using chromic oxide and digestibility was estimated by fecal indexes (N and ADF). Grazing time was determined by observation between milking (9 h). EE was estimated from heart rate and O<sub>2</sub> pulse, methane emissions were determined using the sulfur hexafluoride tracer technique. Individual milk yield and composition were measured daily. Pre-grazing herbage height and biomass above 5 cm were different (48 vs. 37 cm,  $P = 0.0374$ ; 1859 vs. 1447 kg DM ha<sup>-1</sup>;  $P = 0.0500$ , respectively). However, DMI (18.3 kg d<sup>-1</sup>;  $P = 0.5101$ ), grazing time (324 min;  $P = 0.6392$ ), and HP (746 KJ kg MW<sup>-1</sup>,  $P = 0.5524$ ) did not differ among treatments, therefore, FPCM and CH<sub>4</sub> yield were also similar (20.6 kg d<sup>-1</sup>,  $P = 0.7527$ ; 21 g kg DM<sup>-1</sup>,  $P = 0.7115$ , respectively). In the current study, biomass in LHH was higher than attempted, that would explain the lack of difference in daily intake and HP at grazing, and therefore milk production and methane yield among treatments.

**Keywords:** dairy, biomass, intake, energy expenditure, methane emissions



## **1. INTRODUCCIÓN**

Los rumiantes han sido cuestionados por su contribución al cambio climático debido a las emisiones de metano entérico ( $\text{CH}_4$ ), principal gas de efecto invernadero (Gerber *et al.*, 2013). En los sistemas pastoriles, la eficiencia de producción depende en gran medida del uso de las pasturas. Estudios nacionales han demostrado que un aumento en el suministro de concentrados, sin un uso eficiente de la pastura, no contribuye a reducir la Huella de Carbono (HC) (Lizarralde *et al.*, 2014). Éste es el resultado de un bajo consumo, como consecuencia de pasturas de bajo rendimiento (Astigarraga, 2004). Los animales en pastoreo tienen un requerimiento de mantenimiento diario adicional debido a la demanda de energía de las actividades físicas de ingesta de forraje y caminata, lo que explicaría la menor productividad de los sistemas pastoriles, respecto a los de confinamiento (Di Marco y Aello, 2001). En pasturas de baja biomasa, el gasto energético adicional por actividad podría alcanzar entre el 25 y el 30%, debido al costo del pastoreo, lo que debería resultar en un incremento de las emisiones de  $\text{CH}_4$  por litro de leche producida y en la HC. Para Uruguay, con predominio de sistemas lecheros basados en pasturas, es importante ajustar prácticas de manejo que conduzcan a un aumento en la producción de leche y por lo tanto, una reducción en la HC. El objetivo del presente estudio fue cuantificar el efecto de la biomasa a misma asignación de forraje, sobre el consumo, el gasto energético por actividad, la emisión diaria de  $\text{CH}_4$  y la producción de leche corregida por grasa y proteína de vacas lecheras de pastoreo.

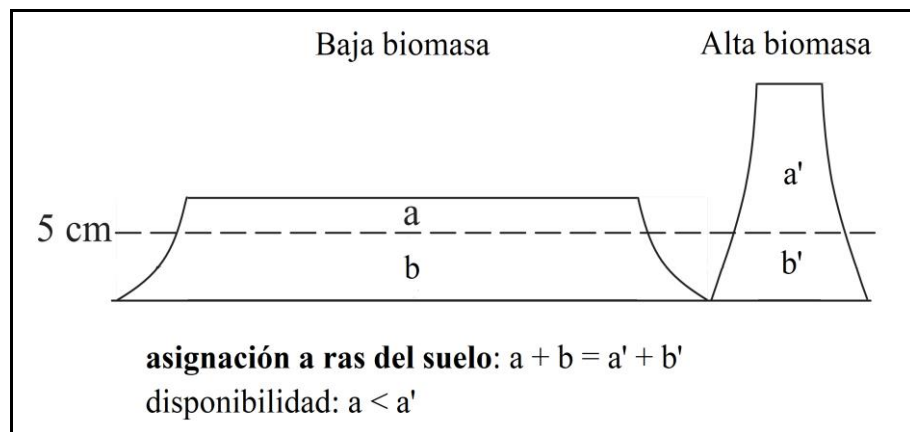
### **1.1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

#### **1.1.1. Efecto de la biomasa pre-pastoreo sobre el consumo en pastoreo**

La disponibilidad de pasto puede definirse como la facilidad con la que la pastura es cosechada por el animal en pastoreo. Se trata de un parámetro complejo que toma en cuenta aspectos de la vegetación (biomasa acumulada  $\text{kg MS ha}^{-1}$ , altura del forraje, % de láminas) así como las interacciones con las cantidades asignadas por animal (Peyraud y Delaby, 2005). De acuerdo a lo mencionado, el consumo de forraje se ve afectado por la biomasa disponible incluso si la asignación del forraje es

similar (Peyraud *et al.* 1996, Delagarde *et al.* 2000, Parga *et al.* 2000 y Pérez-Prieto *et al.* 2012). Es importante tener en cuenta la altura a la cual la asignación es estimada, considerando que la densidad de la pastura aumenta en los estratos más profundos, y por lo tanto la biomasa disponible para el animal variará considerablemente en función de la altura a la cual fue determinada (Delagarde *et al.* 2000, Pérez-Prieto *et al.* 2012). Estos autores observaron que a igual asignación de forraje ( $\text{kg MS a}^{-1} \text{d}^{-1}$ ), cuando esta es expresada a ras del suelo, las vacas que accedieron a pasturas con menor biomasa disponible extendieron el tiempo de pastoreo y en algunos casos, no lograron realizar el mismo consumo que los animales en pasturas con buena disponibilidad. En función de lo antes mencionado, se ejemplifica el concepto de biomasa disponible en la figura 1.

**Figura 1.** Relación entre asignación de forraje expresada a ras del suelo y biomasa disponible como indicador de la accesibilidad del forraje por el vacuno



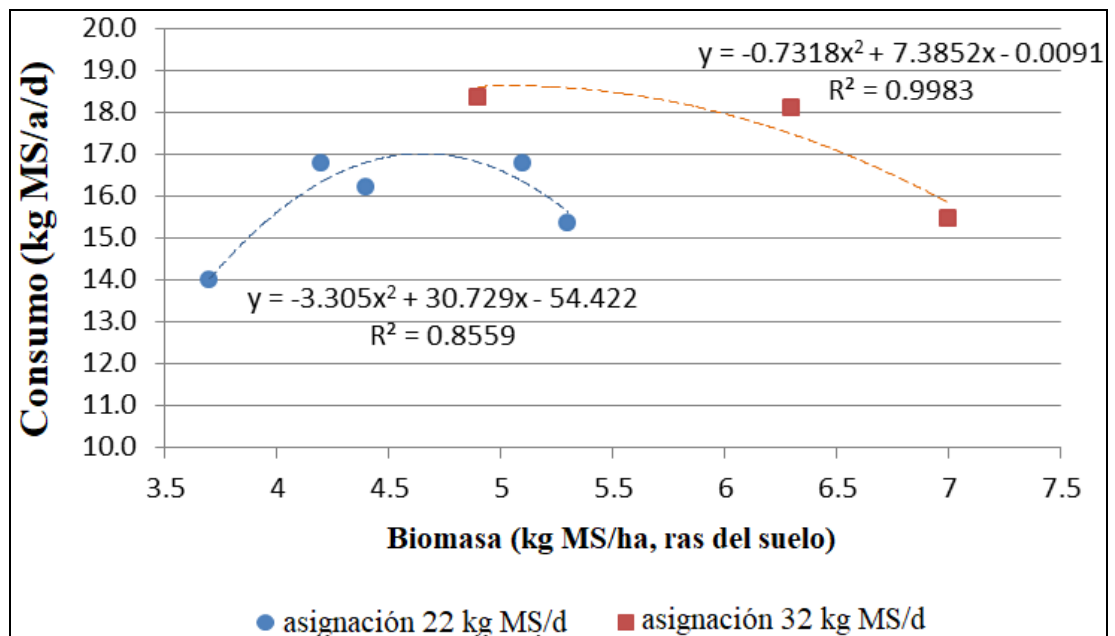
Fuente: adaptado de Pérez-Prieto *et al.* (2012)

La asignación diaria de forraje ( $\text{kg MS a}^{-1} \text{d}^{-1}$ ) se define como el producto entre la biomasa pre-pastoreo y el área ofrecida, y es el principal factor de manejo del pastoreo, que determina la utilización de la pastura por unidad de área (definida como la proporción de forraje removido, en relación al disponible) y el consumo individual, y por lo tanto, la performance diaria del animal (Pérez-Prieto *et al.* 2012, Peyraud *et al.* 1996). La asignación de forraje en pasturas con menor biomasa se

regula ofreciendo un área mayor por animal, pero esta compensación no toma en cuenta la proporción de forraje que queda por debajo de la accesibilidad del vacuno, que es mayor cuanto más baja es la biomasa por unidad de superficie (el forraje es más denso cuanto más próximo a la base de las macollas) (Pérez-Prieto y Delagarde, 2013).

En estudios realizados por Peyraud, *et al.* (1996), donde se evaluó el consumo en vacas lecheras en pasturas de raigrás perenne utilizando una misma asignación de forraje a ras del suelo en pasturas de buena digestibilidad (77% en promedio) con diferente biomasa, se encontró una relación curvilínea entre consumo y biomasa a medida que ésta aumentaba. Estos autores encontraron que el consumo disminuyó levemente en las pasturas de biomasa baja (asociado a una menor altura de la pastura), pero además registraron incrementos decrecientes en la medida que la biomasa aumentaba (Figura 2).

**Figura 2.** Efecto de la biomasa sobre el consumo de vacas lecheras en pastoreo a misma asignación diaria



Fuente: adaptado de Peyraud *et al.* (1996)

Disminuciones en el consumo con biomásas menores también fueron reportadas por Le Du *et al.* (1979) y Combellas y Hodgson (1979) para vacas lecheras pastoreando en franjas, y más recientemente por Roca-Fernández *et al.* (2011) y Pérez-Prieto *et al.* (2012), para vacas lecheras en pastoreo rotativo.

Peyraud *et al.* (1996) encontraron una alta correlación positiva y por ende, un efecto altamente significativo, entre la biomasa y la altura de lámina extendida en pasturas de raigrás. Sin embargo, en la medida que la altura continuaba aumentando (y con ella la biomasa verde), la respuesta en el consumo tendió a ser progresivamente menor, hasta el punto en que incrementos mayores no tuvieron efecto en el consumo de forraje (Astigarraga *et al.* 2002). Estos autores sugieren una relación cuadrática, que admite un rango óptimo entre altura (o biomasa) y consumo. Según estos autores, el consumo de MS no se vería mayormente afectado con biomásas entre 4 y 5.5 t MS ha<sup>-1</sup>, pero puede verse reducido a biomásas menores de 3.5 t MS ha<sup>-1</sup>, si bien en los estudios que reportan estas biomásas tan altas, el efecto sobre el consumo puede verse confundido con el de la pérdida de la calidad de la pastura (Hodgson y Wilkinson, 1968).

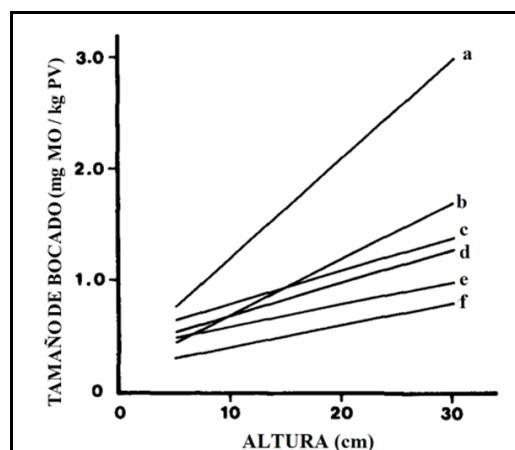
De acuerdo a lo expuesto y en concordancia con Peyraud *et al.* (1996), sería razonable asumir que, a igual asignación de forraje diaria por animal y a similar calidad de forraje, biomásas mayores estén asociadas a consumos mayores, considerando que los animales tendrán acceso a una mayor proporción de forraje fácilmente cosechable antes de alcanzar horizontes más profundos. Este concepto ya fue debidamente desarrollado en ensayos con pastoreo continuo, donde el consumo se encuentra linealmente relacionado a la altura (Forbes 1988, Hodgson 1981). Si bien la razón por la que el consumo decae con alturas mayores (a igual calidad) no es clara, la hipótesis principal planteada por Peyraud *et al.* (1996), se basa en que la cantidad de forraje cosechado sea demasiado grande, lo que implica la necesidad de realizar demasiados movimientos mandibulares por parte del animal para armar el bocado antes de tragarlo (y por lo tanto mayor tiempo), resultando en una reducción

considerable de la frecuencia de bocado (Stakelum y Dillon 2004, Astigarraga y Peyraud 1995). Reducciones en la frecuencia de bocado a mayores biomásas también fueron reportadas por Hodgson (1985) y Penning *et al.* (1994).

### **1.1.2. Efecto de la biomasa pre-pastoreo sobre el gasto energético de vacas en pastoreo**

El consumo a corto plazo de animales en pastoreo está controlado por la combinación de factores nutricionales, que determina el efecto del forraje masticado en el llenado ruminal y factores no nutricionales asociados a la disponibilidad y el manejo de la pastura, que determinan la estructura del forraje y controlan la velocidad de ingestión (Hodgson 1990, Forbes 1988, Poppi *et al.* 1987). El consumo puede definirse como el producto del tamaño de bocado, la tasa de bocado y el tiempo de pastoreo. El tamaño de bocado es la principal variable determinante del consumo, en tanto que la frecuencia de bocado y el tiempo de pastoreo actúan como variables compensatorias (Forbes, 1988). En pasturas en estado vegetativo, la altura de la lámina es el factor de mayor influencia sobre el tamaño de bocado, que aumenta linealmente con la altura (Figura 3). (Astigarraga y Peyraud 1995, Hodgson 1990, Forbes 1988, Penning 1986, Hodgson 1981, Alden y Whittaker 1970).

**Figura 3.** Relación entre altura de la pastura y tamaño de bocado: **a)** Corderos; **b)** terneros; **c)** ovejas; **d)** terneros; **e)** vacas; **f)** vaquillonas

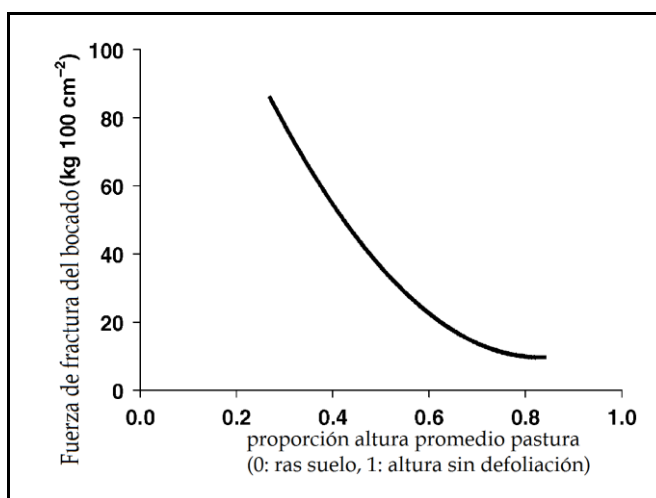


Fuente: Forbes (1988)

A diferencia del pastoreo continuo, donde los animales centran su actividad en un estrato único, en el caso del pastoreo rotativo el animal va defoliando la pastura en estratos desde arriba hacia abajo (Wade y Carvalho, 2000). Considerando la estratificación vertical de la defoliación, se deduce que al aumentar la profundidad de defoliación aumentará la proporción de vaina ingerida y disminuirá la proporción de lámina, lo cual impone una dificultad a la prehensión y un aumento de la energía requerida para cosechar el bocado.

Hughes *et al.* (1991) sugirieron que la resistencia de los componentes estructurales del forraje a medida que se ingresa más abajo en el perfil vertical de la pastura, determinaría las dimensiones del bocado y el peso del bocado, y que la fuerza que ejercen los rumiantes para cosechar el bocado es un límite importante para mantener la velocidad de consumo a lo largo del día. Tharmaraj *et al.* (2003) midieron la fuerza necesaria para cosechar un bocado al ingresar en los estratos inferiores de la pastura, con un rango de variación entre 32,1 a 51,5 kg por cada 100 cm<sup>2</sup> de area defoliada. La variación a lo largo del perfil vertical de la pastura es representada en la figura 4.

**Figura 4:** Variación de la fuerza de prehensión del bocado a medida que aumenta la profundidad de defoliación en el perfil vertical de la pastura



Fuente: Tharmaraj *et al.* (2003)

Como lo sugirieron Laca *et al.* (1993) y Hodgson (1985), el ganado parece ajustar el área de bocado a la fuerza requerida para la prehensión y corte del bocado, explicando así la disminución en el tamaño de bocado al ingresar a los estratos inferiores en el perfil de la pastura.

La baja velocidad de consumo determinada por una menor altura de pastura puede ser compensada total o parcialmente extendiendo el tiempo de pastoreo, llegando hasta 600 min d<sup>-1</sup> en vacas lecheras (Pérez-Prieto *et al.* 2012). Se ha comprobado que, a igual consumo de MS, los vacunos en pastoreo destinan más tiempo a la ingestión y rumia que aquellos en confinamiento (Dohme Meier *et al.*, 2014), indicando mayor actividad física. Estos autores (basados en estudios realizados con diferentes técnicas de medición de gasto energético), afirman que el costo energético por actividad de caminata y pastoreo es mayor al de las actividades de rumia y descanso. En base a esto, se concluye que los animales en pastoreo gastan más energía respecto a aquellos en confinamiento. Este gasto energético (HP) sería mayor en la medida que los animales pastorean pasturas de baja disponibilidad (biomasa por unidad de superficie).

Di Marco y Aello (2001; 2003) reportan para pasturas de buena disponibilidad (2280 kg MS ha<sup>-1</sup>, 26,9 cm), un gasto de energía por actividad bajo, variando entre 8 y 12 % de la energía de mantenimiento (Em). Sin embargo, en pasturas de baja disponibilidad (1489 kg MS ha<sup>-1</sup>, 10,5 cm) con severas limitantes al consumo de forraje, el costo extra de mantenimiento puede alcanzar 20 a 50 % respecto a un animal confinado, principalmente debido al costo de cosecha (NRC 2001, Di Marco y Aello 2003, Faverdin *et al.* 2007, Thanner *et al.* 2014). Una producción extra de calor por actividad debería acompañarse de un incremento proporcional en el consumo de Energía Metabolizable (EM)<sup>1</sup>, ya que, en caso contrario, la energía retenida en producto se verá afectada en igual proporción al gasto (Di Marco y Aello, 2003).

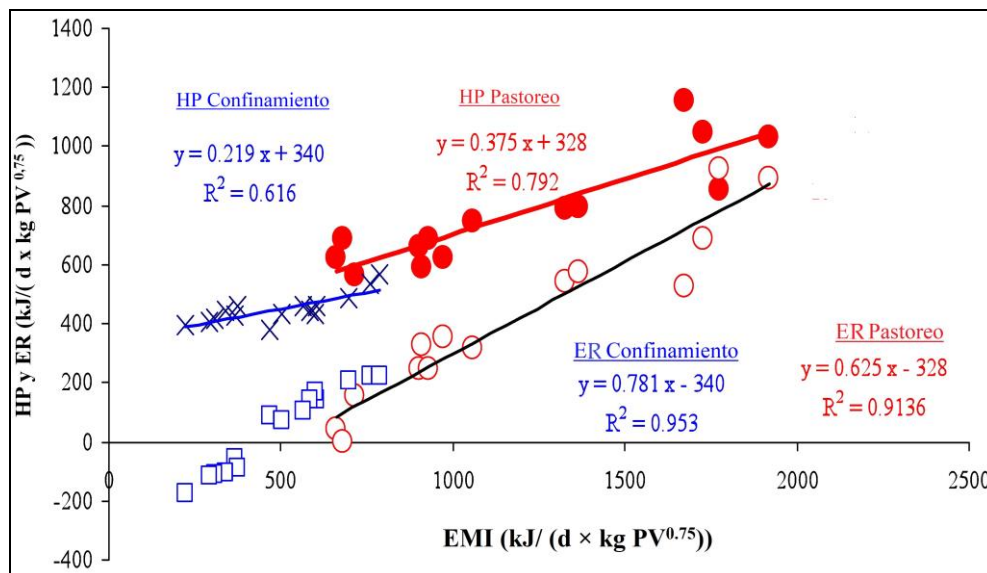
---

<sup>1</sup> De la EM ingerida por el animal, una parte importante se pierde como calor (HP), mientras que el resto se retiene como producto (energía retenida, ER) de acuerdo a la siguiente ecuación:  $EM = HP + ER$

Para estimar el gasto energético (expresado como producción total de calor) de las actividades de pastoreo y caminata, se ha utilizado la técnica de Frecuencia Cardíaca (HR) y pulso de O<sub>2</sub> para estimar el calor producido (Brosh *et al.*, 1998). Este método permite medir el HP de animales en su entorno natural mediante la medición indirecta del consumo de oxígeno (VO<sub>2</sub>). Estudios en vacas lecheras han reportado valores de HP entre 130 y 150 MJ a<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> (relación HP/EM ingerida = 55%), si bien estos valores refieren a animales de alta producción (40 a 50 L a<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>) alimentados con ración (TMR) (Miron *et al.* 2010, Aharoni *et al.* 2006). Sin embargo, cuando los animales están en pastoreo y con menores niveles productivos, es dable esperar una relación HP/EM mayor, ya que HP consume una mayor proporción de la EM ingerida (A. Brosh, comunicación personal, 15 de octubre de 2015). Estimaciones realizadas por Brosh *et al.* (2006) en vacas de carne a lo largo de un año, en pasturas cuya biomasa varió a lo largo del año entre 800 a 2200 kg MS ha<sup>-1</sup> presentan incrementos en HP por actividad de 38 a 74 kJ kg PM<sup>-1</sup>, lo cual corresponde a incrementos en el costo de actividad de 8,5 a 16,5 % por encima de energía de mantenimiento, la cual fue estimada en 450 kJ kg PM<sup>-1</sup> para estos animales. Una recopilación de resultados de ensayos de este equipo de investigación, presenta un incremento en HP de vacas en pastoreo con respecto a vacas en confinamiento (Figura 5).



**Figura 5.** Correlación entre gasto energético (HP) y energía retenida (ER) con la energía metabolizable ingerida (EMI) de vacas en pastoreo y en confinamiento



Fuente: Brosh (2015)

Actualmente el IPCC (2006) propone para el cálculo de la HC, un incremento del 17% de la Energía de Mantenimiento (Em) por actividad, para pasturas de buena disponibilidad.

### **1.1.3. Efecto de la biomasa pre-pastoreo sobre la emisión de metano de vacas en pastoreo**

El proceso de metanogénesis es esencial para el metabolismo ruminal, ya que permite mantener el pH ruminal en condiciones estables para el ecosistema ruminal (Martin *et al.* 2008). El CH<sub>4</sub> producido no puede ser utilizado por el animal, y es liberado a la atmósfera mediante eructos y/o exhalación. Este gas representa de 2 a 12 % de la energía bruta ingerida (EB) que se pierde (Johnson y Johnson, 1995), contribuyendo así a la reducción de la eficiencia de la producción.

En un trabajo realizado en Chile por Muñoz *et al.* (2016) no encontraron diferencias en emisiones diarias de CH<sub>4</sub> para vacas lecheras sobre pasturas de raigrás

perenne (321 g CH<sub>4</sub> d<sup>-1</sup>, en promedio), pero sí reportaron mayores emisiones por unidad de consumo (23,2 g vs. 21,3 CH<sub>4</sub> kg MS<sup>-1</sup>, Y<sub>m</sub> = 7,5 vs. 6,8 %) y por unidad de producto (15,3 vs. 13,6 g CH<sub>4</sub> kg leche<sup>-1</sup>) para las pasturas de mayor biomasa (5145 vs. 2311 kg MS ha<sup>-1</sup>), y menor digestibilidad (81 vs. 84 %). Estudios realizados en Irlanda (Wims *et al.* 2010) reportaron resultados en el mismo sentido, mayores emisiones diarias (+ 42 g) en pasturas de mayor biomasa (2100 vs. 1100 kg MS ha<sup>-1</sup>) pero con menor digestibilidad, y también mayores emisiones por unidad de consumo (17,0 vs. 18,7 g CH<sub>4</sub> kg MS<sup>-1</sup>, Y<sub>m</sub> = 5,4 vs. 6,35 %) y por unidad de producto (13,0 vs. 13,6 g CH<sub>4</sub> kg leche<sup>-1</sup>).

A diferencia de los resultados mencionados, estudios realizados en nuestro país (Dini *et al.* 2012) para vacas lecheras en pasturas con predominancia de gramíneas o leguminosas no mostraron diferencias entre tratamientos para emisiones diarias de metano (368 g CH<sub>4</sub> d<sup>-1</sup>, en promedio), ni se registraron diferencias entre tratamientos para el rendimiento de metano por unidad de consumo (21,3 vs. 22,2 g CH<sub>4</sub> kg MS<sup>-1</sup>, Y<sub>m</sub> = 6,6 %) ni por unidad de producto (18,9 g CH<sub>4</sub> kg leche<sup>-1</sup>) asociado a una calidad del forraje defoliado con similar digestibilidad.

Hasta el momento, pocos estudios se han realizado midiendo simultáneamente el consumo y la producción de metano en pasturas con diferente disponibilidad, pero a similar valor nutritivo de la pastura entre tratamientos, ni se ha cuantificado simultáneamente el costo energético por actividad (Wims *et al.*, 2010; Muñoz *et al.*, 2016).

Para nuestro país, que basa su producción en pasturas y forrajes con concentrados, es importante ajustar prácticas de manejo del pastoreo más eficientes que puedan conducir a un aumento en la producción de leche y a una reducción en el gasto asociado a la actividad y por lo tanto a las emisiones unitarias de gases de efecto invernadero (GEI). Por ello, es importante apuntar a caracterizar para nuestras condiciones de producción, el efecto de la disponibilidad (a misma asignación de forraje por vaca) que posibilite el consumo con menor gasto de cosecha. Este manejo

permitiría disminuir el costo energético extra por actividad y por lo tanto las emisiones de CH<sub>4</sub> asociadas a mantenimiento, contribuyendo así a disminuir la HC asociada a la emisión de metano.

## **1.2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

### **1.2.1. Hipótesis**

A una misma asignación de forraje por animal, una baja biomasa disponible pre-pastoreo estará asociada a un mayor gasto energético por actividad y consecuentemente incrementará la emisión de metano por litro de leche (g CH<sub>4</sub> kg LCGP<sup>-1</sup>).

### **1.2.2. Objetivo general**

Cuantificar, a una misma asignación de forraje por animal, el impacto que tiene la biomasa de la pastura pre-pastoreo sobre el consumo, la producción de leche, la emisión diaria de metano y el gasto energético por actividad en vacas lecheras.

### **1.2.3. Objetivos específicos**

Analizar el efecto de la biomasa sobre el consumo y la producción de vacas lecheras en pastoreo.

Estimar la emisión diaria de metano de vacas lecheras pastoreando praderas con diferente biomasa disponible.

Estimar el costo energético por actividad, en condiciones de diferente biomasa disponible.

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

El experimento se llevó a cabo en la Estación Experimental Bernardo Rosengurtt (32°22'S, 54°26'W, Cerro Largo, Uruguay) de la Facultad de Agronomía (Udelar), durante noviembre 2015, sobre una pastura en base a dactilis (*Dactylis glomerata*) y alfalfa (*Medicago sativa*). Los tratamientos consistieron en dos biomásas pre-pastoreo (ALTA y BAJA). Se utilizó un diseño de Cuadrado Latino Replicado  $2 \times 2$ , con 8 vacas Holando multíparas en lactancia media, pertenecientes al rodeo de la EEER, y dos períodos experimentales de 10 días cada uno (P1 y P2: 5 días de acostumbramiento y 5 días de mediciones). Los animales fueron asignados a los tratamientos en función de la producción de leche inicial ( $21,1 \pm 0,5 \text{ kg d}^{-1}$ ), días de lactancia ( $190 \pm 12,4$ ) y peso vivo ( $536,8 \pm 12,9 \text{ kg}$ ).

### **2.1. PREPARACIÓN DE LA PASTURA PARA LA DETERMINACIÓN DE LOS TRATAMIENTOS**

El área experimental de pastoreo comprendió 8 ha de una pradera en base a dactilis (*Dactylis glomerata*) y alfalfa (*Medicago sativa*), que fue cortada 35 días previo al período experimental, a una altura de 10 cm sobre el nivel del suelo. Para la determinación de los tratamientos se dividió con hilo eléctrico en dos subparcelas, asignándose el 30% del área para el tratamiento ALTA, en tanto que el área restante constituyó el tratamiento de BAJA. La pastura en ALTA no se volvió a cortar, mientras que en BAJA se realizó un corte adicional (a 10 cm sobre el nivel del suelo), 15 días previo al inicio del experimento. El objetivo de los cortes diferenciales entre pasturas fue alcanzar biomásas contrastantes.

La asignación de forraje fue la misma para los animales en ambos tratamientos ( $30 \text{ kg MS a}^{-1} \text{ d}^{-1}$  por encima de 5 cm), durante los dos períodos experimentales. El pastoreo fue realizado en franjas diarias, y la superficie de cada franja fue calculada en función del forraje disponible y la asignación diaria establecida. Luego del ordeño de la mañana los animales ingresaron a una nueva franja.

## **2.2. MEDICIONES EN LAS PASTURAS**

### **2.2.1. Disponibilidad y altura**

Se estimó la disponibilidad pre-pastoreo de cada tratamiento en d2, d5 y d8, para ambos períodos experimentales. Para ello se realizaron cortes de 3 bandas al azar (10 m × 0,5 m), con una altura de corte de 5 cm sobre el nivel del suelo, utilizando para estos efectos una cortadora de forraje Honda (modelo HRC 216, Japón). Posteriormente se tiraron al azar dos cuadros (0,3 m × 0,3 m) dentro de cada banda, a los efectos de determinar el forraje remanente al ras del suelo. Las muestras de forraje fueron pesadas en fresco, y una muestra de aproximadamente 500 g fue secada en estufa, a 60°C para la determinación de materia seca y análisis químico del forraje ofrecido. Además, se realizaron 50 mediciones al azar de la altura de la pastura (lámina extendida) con una regla graduada (precisión ±1 mm), cubriendo toda la superficie de la franja diaria asignada en cada tratamiento. Se realizó el mismo procedimiento post-pastoreo, para la determinación del forraje remanente, las mediciones en este caso se realizaron en d4, d7 y d10 para los dos períodos. La disponibilidad total a ras del suelo se calculó como la suma de la biomasa medida por encima y por debajo de la altura de corte de la máquina cortadora (5 cm). La utilización de forraje se calculó como la diferencia entre la biomasa pre-pastoreo y post-pastoreo, expresada en términos de porcentaje de la biomasa pre-pastoreo. La profundidad media de defoliación se estimó por diferencia entre los valores de altura media de las plantas antes y después del pastoreo.

### **2.2.2. Composición botánica y morfológica**

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 externo de cada una de las bandas cortadas. Posteriormente se juntaron las 3 muestras por banda, formando una muestra compuesta, acondicionada en una bolsa plástica y almacenada congelada -20 °C para su posterior análisis. En el laboratorio, se tomó una sub-muestra de cada una de estas muestras y se procedió a su clasificación como gramíneas o leguminosas y malezas. Luego, cada una de estas

sub-muestras fue cortada en estratos cada 5 cm y cada estrato fue separado en tallo, hoja, restos secos, inflorescencia y malezas. Cada fracción fue secada en estufa a 60 °C durante 48 h para la determinación de su contenido de MS.

## 2.3. MEDICIONES EN LOS ANIMALES

### 2.3.1. Consumo

Para la determinación de consumo diario se utilizó Óxido de Cromo ( $\text{Cr}_2\text{O}_3$ ) como marcador externo para la estimación de la producción de heces, y Nitrógeno fecal ( $N_f$ ) y Fibra Detergente Ácido fecal ( $FDA_f$ ) como indicadores internos para la estimación de la digestibilidad de la MO de la pastura consumida. La ecuación utilizada para los cálculos fue ajustada por Comeron y Peyraud (1993):

$$(1) DMO = 0,791 + 0,0334N_f - 0,0038FDA_f (R^2 = 0,89)$$

donde:  $DMO$  es la digestibilidad de la MO (g kg),  $N_f$  es la concentración de nitrógeno de la MO fecal (g kg  $\text{MO}^{-1}$ ) y  $FDA_f$  es la concentración de fibra detergente ácido en la MO fecal (g kg  $\text{MO}^{-1}$ ).

Para este propósito se elaboró un concentrado a base de afrechillo de arroz, conteniendo 5 % (BF) de  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  que se ofreció dos veces al día (al momento del ordeño), a razón de 200g cada vez, de modo de asegurar un suministro diario de 20g de  $\text{Cr}_2\text{O}_3$ . La dosificación comenzó desde el día 1 del experimento, con el objetivo de alcanzar un estado de equilibrio a nivel ruminal previo a las mediciones. La colecta de heces se realizó diariamente, dos veces al día luego de cada ordeño, durante d6 a d10 de cada período. Cada una de las colectas (con un peso fresco aproximado de 400 g) fue identificada y secada en estufa a 60 °C durante 72 h para su determinación de MS, concentración de  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  y composición química. El remanente de las muestras luego del análisis se agrupó según tratamiento y se almacenó en un lugar seco.

### **2.3.2. Comportamiento en pastoreo**

Se determinó el tiempo de pastoreo y la frecuencia de bocados en d7 de cada período experimental en la sesión de pastoreo entre ordeños (9:00 a 18:00 h). Se observó a los animales en la parcela, registrando cada 5 min el comportamiento de cada animal (ingestión, rumia, descanso) y contando (por cronómetro) el número de bocados por minuto durante los períodos de ingestión.

### **2.3.3. Producción individual y composición de la leche**

La producción individual de leche fue medida dos veces al día, en la mañana (7:30 a 8:00 h) y en la tarde (18:30 a 19:00 h). El contenido de grasa, proteína y lactosa de la leche fue determinado durante 4 días por período experimental (entre d6 y d10 en cada período). La leche corregida por contenido de grasa y proteína (LCGP) fue calculada según la ecuación propuesta por IDF (2010).

### **2.3.4. Peso vivo**

Las vacas fueron pesadas al inicio y al final de cada período experimental (d1 y d10).

### **2.3.5. Emisiones de CH<sub>4</sub>**

Previo al inicio del ensayo, se introdujo en el rumen de cada uno de los animales una cápsula emisora de SF<sub>6</sub> (con una tasa de permeación diaria promedio de  $4,626 \pm 0,339$  mg d<sup>-1</sup>), utilizando un lanza bolo ruminal. La colecta de gases se realizó por medio de 2 recipientes colectores (con estanqueidad probada) por animal para aumentar la eficiencia de muestreo. Cada par de recipientes se sujetó al animal mediante bozales diseñados especialmente para este propósito, y permaneció en el animal durante los 5 días de muestreo por período experimental (d6 a d10), de acuerdo a la técnica de Johnson *et al.* (1994) adaptada por Gere y Gratton (2010). Además de las muestras colectadas de los animales, se tomó una muestra de aire atmosférico en la proximidad de las parcelas experimentales a los efectos de determinar el nivel base de CH<sub>4</sub>, el período de muestreo para este caso fue el mismo que el de medición en los animales. Las muestras fueron analizadas inmediatamente después de finalizado cada período experimental mediante cromatografía gaseosa.

Luego de la obtención de los análisis cromatográficos de las muestras, la emisión diaria de CH<sub>4</sub> por animal se calculó utilizando la tasa de liberación de la cápsula de SF<sub>6</sub> y los resultados obtenidos de la concentración de CH<sub>4</sub> y SF<sub>6</sub>, de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$(2) CH_4 (g d^{-1}) = TPSF_6 (g d^{-1}) \times ([CH_4]/[SF_6])$$

donde: *TPSF<sub>6</sub>* es la tasa de liberación de SF<sub>6</sub> de la cápsula y *[CH<sub>4</sub>]* y *[SF<sub>6</sub>]* son las concentraciones de estos gases (en ppm y ppt, respectivamente) por encima de las concentraciones atmosféricas.

### **2.3.6. Partición de energía y gasto energético**

Para estimar el HP por actividad, expresado como producción total de calor, se utilizó la técnica de Frecuencia Cardíaca (HR) y pulso de O<sub>2</sub> (O<sub>2</sub>P) reportada por Brosh *et al.* (1998). Este método permite medir el HP de animales en su entorno natural mediante la medición indirecta del consumo de oxígeno (VO<sub>2</sub>). En animales homeotérmicos, como los rumiantes, la mayoría del O<sub>2</sub> usado es transportado hacia los tejidos por la acción del corazón. En base a esto, se hace válido el uso de la HR para la estimación de VO<sub>2</sub>, y por lo tanto del HP. El método de estimación de VO<sub>2</sub> mediante la HR se basa en la ecuación de convección de Fick para el sistema cardiovascular: (3)  $VO_2 = HR \times [V_s (C_aO_2 - C_vO_2)]$  donde: *V<sub>s</sub>* es el volumen sistólico (cantidad de sangre bombeada por pulsación) y *C<sub>a</sub>O<sub>2</sub>* y *C<sub>v</sub>O<sub>2</sub>* son los contenidos de O<sub>2</sub> de la sangre arterial y venosa, respectivamente (Brosh, 2007). Así, el HP puede determinarse a partir de mediciones de HR, registradas diariamente en el transcurso de varios días, multiplicado por el VO<sub>2</sub> por pulsación (pulso de O<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>P).

Para ello, la frecuencia cardíaca fue registrada de forma continua mediante dispositivos radiotransmisores (Heart Rate Radiotransmitters) ajustados en el animal por medio de arneses, durante 4 días en cada período experimental (d6 a d9). Al inicio de cada período experimental (d6) se determinó el pulso de O<sub>2</sub> midiendo simultáneamente las pulsaciones cardíacas y el consumo de O<sub>2</sub>. El consumo de O<sub>2</sub>



fue medido simultáneamente con la HR durante un período de 10 min utilizando un sistema de circuito respiratorio abierto con máscara, inmediatamente después del período de medición de HR, tal como lo describen Brosh *et al.* (1998). La producción total de calor (HP) fue cuantificada a través de las siguientes ecuaciones (Brosh, 2007):

$$(4) \text{HP diario} = \text{HP específico} \times \text{kg PV}^{0,75}$$

$$(5) \text{HP específico} = \text{HR} \times \text{O}_2\text{P} \times 20,47 / 1000 \times 60 \times 24$$

donde: *HP diario* es la producción de calor diario expresada en MJ vaca<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup>, *PV*<sup>0,75</sup> es el peso metabólico del animal, *HP específico* es la producción de calor expresada en kJ kg *PV*<sup>-0,75</sup> d<sup>-1</sup>; *HR* es la frecuencia cardíaca individual (pulsaciones min<sup>-1</sup>); *O*<sub>2</sub>*P* es el pulso de O<sub>2</sub> (consumo de O<sub>2</sub> por pulsación, en mL min<sup>-1</sup>) y 20,47 es la constante que representa la energía disipada (kJ L O<sub>2</sub><sup>-1</sup>) (Nicol y Young, 1990).

El valor de HP medido por este método fue comparado con el valor de HP predicho en función de la EM ingerida y la energía retenida por el animal (ER). Para este análisis se realizó un cálculo de la partición de energía en función de los datos experimentales. La energía bruta (EB) ingerida se calculó como el producto entre el contenido de EB de la pastura defoliada y la cantidad de MS ingerida por los animales. La energía digestible (ED) ingerida se calculó sustrayendo la EB en heces a la EB ingerida. La energía metabolizable (EM) se determinó restando a la ED la energía perdida como CH<sub>4</sub> y como orina. La energía perdida como CH<sub>4</sub> se determinó multiplicando la emisión diaria (g) por su energía contenida (0,05495 MJ g<sup>-1</sup>). La energía en orina se calculó a partir del N excretado en orina, mediante la ecuación de Street *et al.* (1964):

$$(6) \text{EO} = 0,026 + 0,117 (\text{NO } \%); n = 402, R = 0,92$$

donde:  $EO$  es la energía perdida en orina por kg de peso metabólico ( $\text{kcal kg PM}^{-1}$ ),  $NO\%$  es el nitrógeno en orina como porcentaje, calculado sustrayendo al N ingerido, el N heces y el N leche (suponiendo no retención de N en tejido).

La energía retenida en leche se calculó de acuerdo al sistema INRA (1989) para la leche corregida al 4 % de grasa:

$$(7) \quad EL = 0,75 \times 4,1868 [0,4 PL + 15 \% G / 100 \times PL]$$

donde:  $EL$  es la energía retenida en leche ( $\text{MJ kg}^{-1}$ );  $PL$  es la producción de leche,  $G$  es el porcentaje de grasa.

La energía retenida en reservas corporales ( $Er$ ) se consideró despreciable ya que el período experimental es demasiado corto como para evidenciar cambios en condición corporal. Considerando esto, la energía retenida total ( $ER$ ), calculada como la suma de la energía retenida en leche ( $EL$ ) y  $Er$ , en este caso será igual a la energía retenida en leche ( $ER = EL$ ). El cálculo de HP predicho es:

$$(8) \quad HP \text{ predicho} = EM \text{ ingerida} - EL$$

El residual de HP, fue calculado como la diferencia entre HP medido y HP predicho.

## 2.4. ANÁLISIS QUÍMICOS

Los análisis de composición química de heces y pasturas fueron realizados en el Laboratorio de Nutrición Animal de la Facultad de Agronomía (Udelar). El contenido de materia seca analítica (MS) de las muestras de forraje y de heces se determinó por secado a  $105^{\circ}\text{C}$  durante 24 h, las muestras luego fueron molidas utilizando un tamiz de malla de 1 mm. El contenido de cenizas (C) se determinó en una Mufla a  $600^{\circ}\text{C}$  durante tres horas, y la proteína cruda (PC) por el método Kjeldahl, según AOAC (1990). El contenido de fibra detergente neutro (aFDN<sub>mo</sub>) se determinó sin sulfito de sodio y con amilasa estable al calor. La fibra detergente

ácido (FDAmo) y lignina detergente ácido (Ligas) fueron determinadas de forma secuencial (corregido por cenizas) por el método de Van Soest *et al.* (1991). Para la determinación de Energía Bruta se utilizó una bomba calorimétrica adiabática (Gallenkamp Autobomb; Loughborough, Leics, Reino Unido).

Los contenidos de grasa, proteína y lactosa de las muestras de leche se analizaron en el laboratorio de COLAVECO (Nueva Helvecia, Colonia, Uruguay) mediante espectroscopia infrarroja, usando Bentley 2000 (Bentley Inc. EE.UU.).

La concentración de 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) en el laboratorio de Fertilidad de Suelos de la Facultad de Agronomía (Udelar). También se determinó el cromo contenido en la ración ofrecida a las vacas para verificar la cantidad suministrada.

Las concentraciones de CH<sub>4</sub> y SF<sub>6</sub> fueron determinadas por cromatografía gaseosa en el Laboratorio de Nutrición Animal de la Facultad de Agronomía (Udelar). Para CH<sub>4</sub> se utilizó un loop de 3 ml, una columna HP-PLOTQ y un detector de ionización de llama, los picos de CH<sub>4</sub> cuantificables se compararon contra un estándar de concentración conocida. Para el SF<sub>6</sub> se utilizó un loop de 10 mL, una columna HPMOLSIV 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 CH<sub>4</sub> y SF<sub>6</sub> respectivamente.

## 2.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todas las mediciones realizadas fueron analizadas de acuerdo al diseño de Cuadrado Latino Replicado  $2 \times 2$ , mediante ANOVA.

Las mediciones realizadas en los animales se analizaron mediante el PROC MIXED del paquete estadístico SAS (2001).

Para consumo diario, emisiones de CH<sub>4</sub>, comportamiento en pastoreo, partición de energía y gasto energético, se utilizó el siguiente modelo:

$$(9) Y_{ijk} = \mu + T_i + P_j + A_k + \varepsilon_{ijk}$$

donde:  $Y_{ijk}$  es la variable bajo consideración;  $\mu$  es el efecto de la media general;  $T_i$  es el efecto del tratamiento;  $P_j$  es el efecto del período, analizados como efectos fijos;  $A_k$  es el efecto animal, analizado como efecto aleatorio, y  $\varepsilon_{ijk}$  es el término del error experimental.

Las mediciones de producción y composición de leche se analizaron como medidas repetidas en el tiempo, según un modelo autorregresivo de orden 1 (Littel *et al.*, 2000), se consideró la producción individual del primer día de cada período como covariable para dicho análisis. El modelo utilizado fue:

$$(10) Y_{ijklm} = \mu + T_i + D_j + P_k + A_l + \beta_m + \varepsilon_{ijklm}$$

donde:  $Y_{ijklm}$  es la variable bajo consideración;  $\mu$  es el efecto de la media general.  $T_i$  es el efecto del tratamiento;  $D_j$  es el efecto del tiempo y  $P_k$  es el efecto del período, todos analizados como efectos fijos;  $A_l$  es el efecto animal, analizado como efecto aleatorio;  $\beta_m$  es la covariable para producción de leche y  $\varepsilon_{ijklm}$  es el término del error experimental.

Las mediciones realizadas en las pasturas se analizaron utilizando el PROC GLM del paquete estadístico SAS (2001), de acuerdo al siguiente modelo:

$$(11) Y_{ij} = \mu + T_i + P_j + \varepsilon_{ij}$$

donde:  $Y_{ij}$  es la variable bajo consideración;  $\mu$  es el efecto de la media general;  $T_i$  es el efecto del tratamiento;  $P_j$  es el efecto del período, ambos considerados como efectos fijos, y  $\epsilon_{ij}$  es el término del error experimental.

Para todos los análisis, tanto en los animales como en la pastura, se analizaron las interacciones entre tratamiento y período, pero no fueron incluidas en el modelo final por no encontrarse diferencias estadísticamente significativas, tal como se recomienda en Lorenzen y Anderson (1993). Por lo tanto, en el trabajo se presentan las medias por tratamiento, utilizando el test de comparación de medias de la Diferencia Mínima Significativa.

### **3. RESULTADOS**

#### **3.1. CARACTERIZACIÓN AGROCLIMÁTICA DE LA ZONA**

La temperatura media (Tmed.) durante noviembre de 2015 fue menor al promedio de los 10 años anteriores, asociado a una menor temperatura máxima (Tmax.) en este mes (-3 °C). Durante la duración de P1, la Tmax. fue aún menor al promedio del mes (- 2 °C) mientras que durante el desarrollo de P2, la Tmax. fue mayor al promedio del mes (+1 °C). En cuanto a la precipitación acumulada para noviembre 2015, ésta fue mayor al promedio de los 10 años anteriores (+ 30%): en P1 llovió 29 mm, en tanto que durante P2 llovió 50 mm (Cuadro 1).

**Cuadro 1:** Variables climáticas promedio para el mes de noviembre, en la Estación Meteorológica de Melo

Año	Tmax.	Tmin.	Tmed.	PPacum
2004 -2014	27	14	20	77
2015	24	14	19	103
P1 †	22	15	18	29
P2 ‡	25	15	20	50

† desde 26/10/2015 a 3/11/2015; ‡ desde 4/11/2015 a 13/11/2015

Fuente: INUMET

#### **3.2. CARACTERÍSTICAS DE LA PASTURA**

##### **3.2.1. Biomasa pre-pastoreo**

La biomasa disponible por encima de 5 cm fue mayor para ALTA (+ 412 kg MS ha<sup>-1</sup>;  $P = 0,0500$ ), al igual que la altura pre-pastoreo (+ 11 cm;  $P = 0,0374$ ). Tanto la composición botánica de la pastura, expresada como proporción de gramíneas (89 % en promedio), como su composición morfológica expresada como proporción de lámina (60 % en promedio) no mostraron diferencias significativas entre tratamientos. Tampoco se encontraron diferencias en su composición química (por encima de 5 cm) (Cuadro 2).

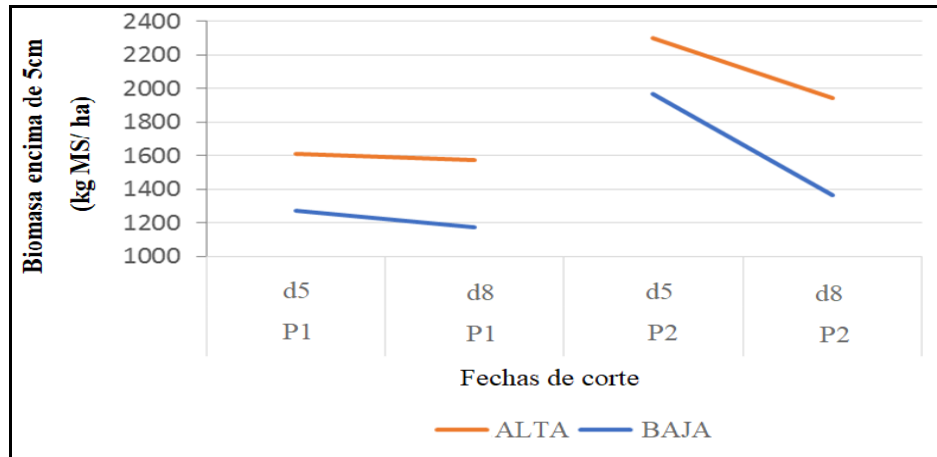
**Cuadro 2:** Caracterización de la pastura ofrecida según biomasa disponible

	Biomasa		EEM	<i>P</i>
	ALTA	BAJA		
Biomasa encima 5 cm (kg MS ha <sup>-1</sup> )	1859	1447	160,1	0,0500
Biomasa por debajo de 5 cm (kg MS ha <sup>-1</sup> )	1912	1837	309,5	0,8707
Altura (cm) <sup>a</sup>	48	37	3,9	0,0374
Relación Gramínea: Leguminosa <sup>b</sup>	86	91	2,5	0,1119
Proporción de lámina (%) <sup>cd</sup>	63	57	7,9	0,4662
Composición Química (g kg MS <sup>-1</sup> ) <sup>d</sup>				
MS (g kg <sup>-1</sup> )	272	279	10,5	0,6051
MO	909	905	5,2	0,5524
PC	137	142	2,4	0,2635
aFDN <sub>mo</sub>	588	566	9,8	0,2661
FDA <sub>mo</sub>	321	294	11,3	0,2507
Lignina (as)	84	57	3,3	0,0773
EB (MJ kg MS <sup>-1</sup> )	16,7	16,2	0,85	0,6344

<sup>a</sup> medida como lámina extendida; <sup>b</sup> expresada como porcentaje de gramínea; <sup>c</sup> encima de 5 cm; <sup>d</sup> como % de MS total de gramínea

Sin embargo, se observó una diferencia en biomasa medida encima de 5 cm, entre P1 (1410 kg MS ha<sup>-1</sup> en promedio) y P2 (1897 kg MS ha<sup>-1</sup>) ( $P = 0.0288$ ), asociado a las condiciones meteorológicas contrastantes en temperatura y precipitaciones entre ambos períodos (Figura 6).

**Figura 6.** Evolución de la biomasa según tratamiento entre el período 1 y el período 2 del experimento



### 3.2.2. Forraje desaparecido

La altura post-pastoreo del forraje fue significativamente menor para BAJA (-8 cm;  $P = 0,0015$ ). Sin embargo, la profundidad de defoliación fue similar entre tratamientos (20 cm en promedio), representando 44% y 54% de la altura inicial para el tratamiento ALTA y BAJA respectivamente. El porcentaje de utilización del forraje ofrecido tampoco difirió entre tratamientos (38 % en promedio), así como la composición química del forraje defoliado (Cuadro 3).



**Cuadro 3:** Caracterización del forraje desaparecido según biomasa disponible

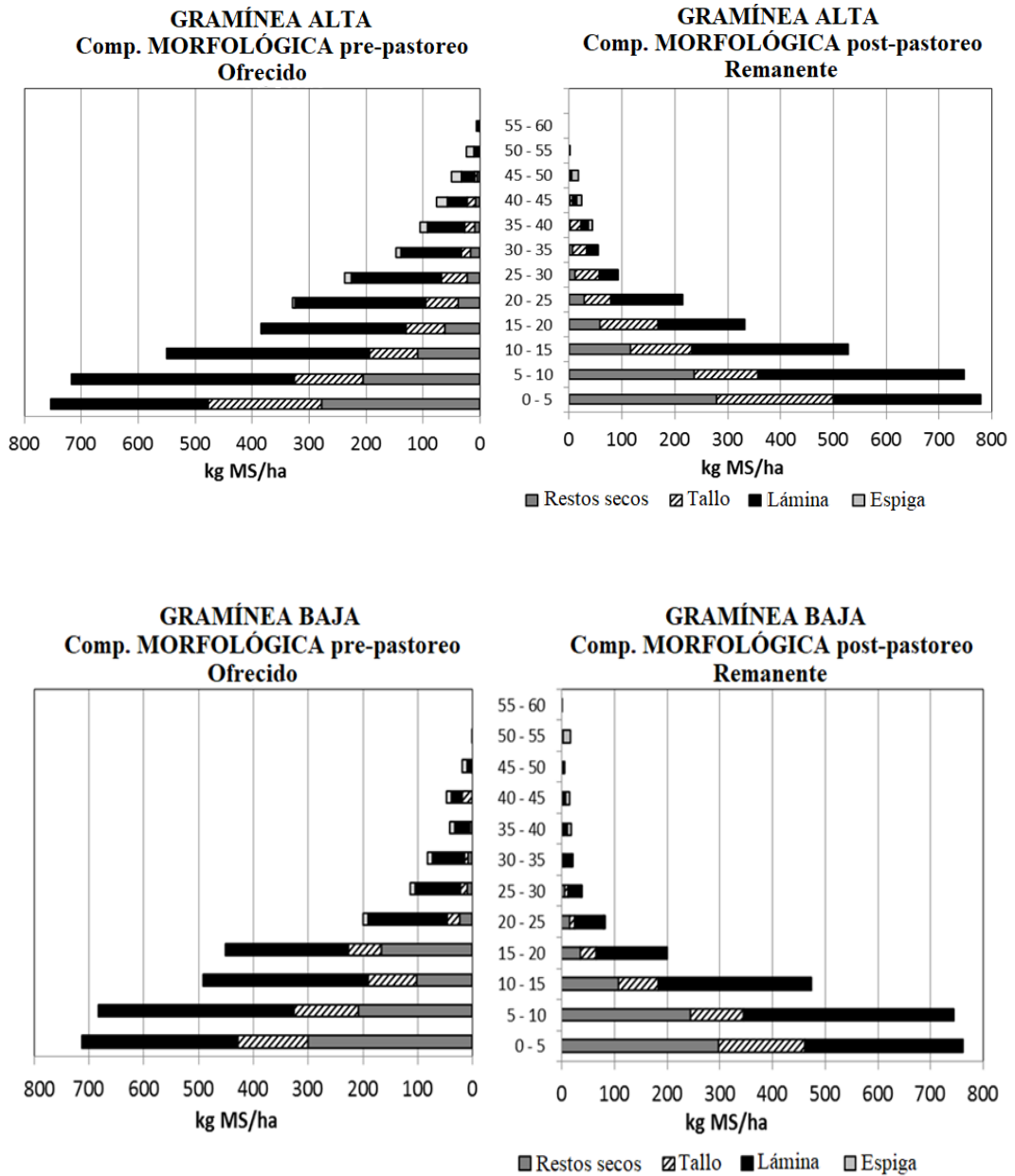
	Biomasa		EEM	<i>P</i>
	ALTA	BAJA		
Altura post-pastoreo (cm) <sup>†</sup>	27	19	1,21	0,0015
Profundidad defoliación (cm)	21	20	3,05	0,7764
Utilización del forraje (%) <sup>#</sup>	39	36	6,34	0,6790
Composición química (g kg MS <sup>-1</sup> )				
MS (g kg <sup>-1</sup> )	922	920	1,0	0,3919
MO	903	913	22,2	0,7409
PC	137	147	5,4	0,3100
aFDNmo	577	599	6,0	0,1695
FDAmo	271	280	0,1	0,0335
Lignina (as)	54	66	9,4	0,4150
EB (MJ kg MS <sup>-1</sup> )	16,6	16,1	0,80	0,6444

<sup>†</sup> medida como lámina extendida; <sup>#</sup> encima de 5 cm

Con respecto a la comparación entre la composición química de la pastura ofrecida y de la pastura defoliada, no se encontraron diferencias significativas salvo por el contenido FDA, que fue mayor para la pastura ofrecida (+ 32 g kg MS<sup>-1</sup>; *P* = 0,0153).

La estructura (por estratos de 5 cm) del forraje ofrecido y remanente luego de la defoliación, para la fracción gramínea, se presenta en la figura 7.

**Figura 7.** Estructura de la pastura (fracción gramínea) ofrecida y remanente por estrato de 5 cm, según biomasa (ALTA y BAJA)



En promedio, el 50% de la biomasa estimada a ras del suelo estuvo en los dos primeros estratos. Los animales defoliaron los estratos superiores más ricos en lámina, la proporción de lámina en relación al total (MS) defoliado no difirió entre tratamientos y fue 60 % ( $P = 0,9038$ ).

### 3.3. CONSUMO, COMPORTAMIENTO EN PASTOREO Y PRODUCCIÓN

#### 3.3.1. Producción de heces, digestibilidad y consumo

Tanto la cantidad de heces excretadas (4,4 kg MO d<sup>-1</sup>, en promedio) como la digestibilidad de la pastura consumida (740 g kg MO<sup>-1</sup>, en promedio) fueron similares entre tratamientos. En consecuencia, el consumo diario de MO y de MS tampoco difirieron entre tratamientos (16,7 kg MO y 18,3 kg MS en promedio) (cuadro 4).

**Cuadro 4.** Producción de heces, consumo y la digestibilidad de vacas lecheras en pasturas con diferente biomasa

	Biomasa			<i>P</i>
	ALTA	BAJA	EEM	
Heces producidas (kg MO d <sup>-1</sup> )	4,5	4,2	0,28	0,3982
Digestibilidad MO pastura consumida (g kg MO <sup>-1</sup> )	737	743	5,5	0,2811
Consumo MO forraje (kg a <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	17,0	16,4	0,63	0,5102
Consumo MS forraje (kg a <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	18,6	18,0	0,69	0,5101
Consumo MO digestible (kg a <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	12,5	12,2	0,46	0,5836

#### 3.3.2. Comportamiento

No se encontraron diferencias entre tratamientos para el tiempo de ingestión (324 min, en promedio). Sin embargo, el tiempo de rumia fue mayor para los animales en ALTA (+ 35 min; *P* = 0,0467), mientras que el tiempo de descanso tendió a ser mayor en BAJA (28 min; *P* = 0,0934). En cuanto a la frecuencia de bocado, la misma fue mayor para el tratamiento BAJA (+ 8 bocados min<sup>-1</sup>; *P* = 0,0296) (cuadro 5).

**Cuadro 5.** Comportamiento de vacas lecheras en pasturas con diferente biomasa

	Biomasa		EEM	<i>P</i>
	ALTA	BAJA		
Ingestión (min) <sup>a</sup>	320	327	13,7	0,6392
Rumia (min)	133	98	15,6	0,0467
Descanso (min)	47	75	10,6	0,0934
Frecuencia de Bocados (N° min <sup>-1</sup> )	36	42	2,5	0,0296

<sup>a</sup>Horario de observación del comportamiento: 9 a 18 h

Si tomamos en cuenta el tiempo de ingestión, y la frecuencia de bocados durante el período de observación, el número de bocados fue 11.510 y 13.734 para los tratamientos ALTA y BAJA respectivamente.

### **3.3.3. Producción, composición de leche y variación de peso vivo**

No se observaron diferencias en producción individual entre tratamientos (21,1 kg d<sup>-1</sup>; 20,6 kg LCGP d<sup>-1</sup>), aunque sí se encontraron diferencias en su composición, con contenidos de grasa (+ 1,8 g kg<sup>-1</sup>; *P* = 0,0054) y de proteína (+ 0,8 g kg<sup>-1</sup>; *P* = 0,0060) mayores en BAJA (cuadro 6).

**Cuadro 6:** Producción, composición de leche y variación de peso vivo de las vacas pastoreando en pasturas con diferente biomasa

	Biomasa		EEM	<i>P</i>
	ALTA	BAJA		
Producción de leche (kg a <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	21,3	20,9	0,48	0,3475
Contenido de grasa (g kg <sup>-1</sup> )	38,6	40,4	0,64	0,0054
Contenido de proteína (g kg <sup>-1</sup> )	30,8	31,5	0,79	0,0060
Contenido de lactosa (g kg <sup>-1</sup> )	47,7	47,9	0,33	0,5531
Rendimiento de grasa (g d <sup>-1</sup> )	821	839	21,5	0,3868
Rendimiento proteína (g d <sup>-1</sup> )	656	662	15,7	0,6872
Rendimiento lactosa (g d <sup>-1</sup> )	1019	1000	23,7	0,4174
Leche Corregida por Grasa y Proteína (kg a <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	20,6	20,7	0,47	0,7527
Variación de peso (%)	-1,93	3,47	1,7	0,0087

### 3.4. EMISIONES DE METANO

El análisis de emisiones de CH<sub>4</sub> fue realizado para 6 vacas en vez de 8 vacas, ya que dos de ellas no presentaron registros que pudieran ser analizados.

La emisión diaria de CH<sub>4</sub> fue similar entre tratamientos (363 g d<sup>-1</sup> y 551 L d<sup>-1</sup>, en promedio). Tampoco se vieron diferencias significativas en el promedio de emisiones expresado por unidad de producto (18,3 g kg LCGP<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>, en promedio) ni por kg de MS ingerida (21 g kg MS<sup>-1</sup> en promedio) o como porcentaje de la EB ingerida (7,0 % en promedio) (Cuadro7).

**Cuadro 7.** Emisiones diarias y rendimiento de metano de las vacas pastoreando en pasturas con diferente biomasa

	Biomasa		EEM	<i>P</i>
	ALTA	BAJA		
Emisión de metano (g a <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	374	353	34,9	0,6852
(L a <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	566	535	73,0	0,6822
Emisión unitaria de metano (g kg LCGP <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	19,1	17,6	2,52	0,5802
Rendimiento metano				
como Energía Bruta Ingerida (Ym)	6,8	7,3	0,59	0,5691
como g metano kg MS Ingerida <sup>-1</sup>	20,5	21,5	2,73	0,7115

### 3.5. GASTO ENERGÉTICO

El pulso de oxígeno (O<sub>2</sub>P) fue similar entre tratamientos (0,290 mL O<sub>2</sub> pulsación<sup>-1</sup> kg PM<sup>-1</sup>, en promedio) así como la frecuencia cardíaca promedio (HR) (87,3 pulsaciones min<sup>-1</sup>; *P* = 0,2284).

La partición de la energía no difirió entre tratamientos. La EB ingerida promedio fue 2731 kJ kg PM<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> (*P* = 0,4680), la energía contenida en las heces fue 901 kJ kg PM<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> en promedio (*P* = 0,5339), la ED ingerida fue 1830 kJ kg PM<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> en promedio (*P* = 0,4693). Las pérdidas de energía como metano y orina en

promedio fueron 167 kJ kg PM<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> ( $P = 0,5571$ ) y 88 kJ kg PM<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> ( $P = 0,5486$ ) respectivamente y la EM ingerida promedio para ambos tratamientos fue de 1575 kJ kg PM<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> ( $P = 0,4334$ ). La energía retenida en leche fue 564 kJ kg PM<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> en promedio para ambos tratamientos ( $P = 0,5400$ ), representando el 36% de la EM ingerida.

El gasto energético (HP) tampoco difirió entre tratamientos y los valores promedio fueron 746 y 1053 kJ kg PM<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> para HP medido y HP predicho, respectivamente. El residual de HP, calculado como la diferencia entre HP medido y HP predicho, fue - 307 kJ kg PM<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> en promedio (Cuadro 8).

**Cuadro 8.** Pulso de oxígeno (O<sub>2</sub>P), frecuencia cardíaca (HR), partición de energía y gasto energético (HP) de vacas pastoreando en pasturas con diferente biomasa

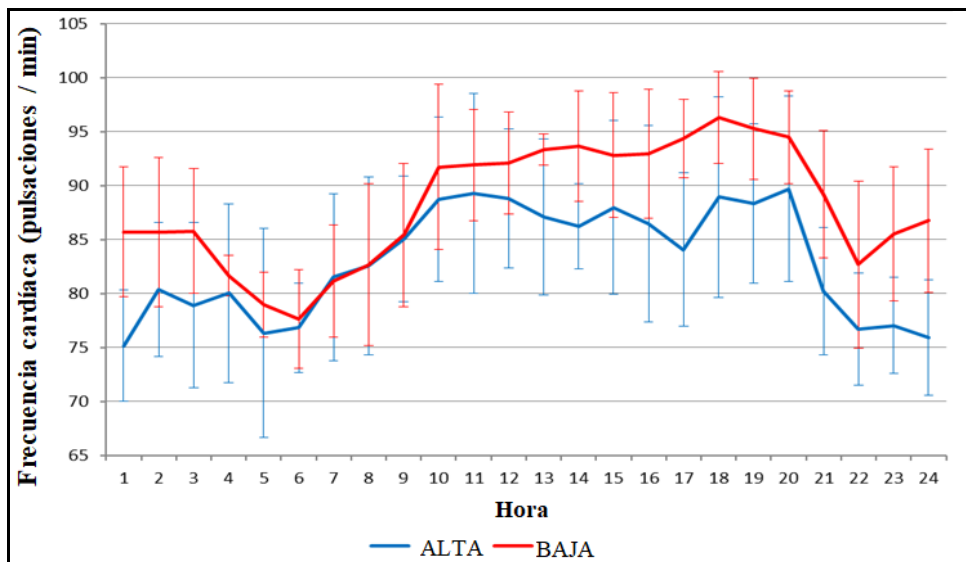
	Biomasa		EEM	<i>P</i>
	ALTA	BAJA		
O <sub>2</sub> P (mL O <sub>2</sub> pulsación <sup>-1</sup> kg PM <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	0,300	0,280	0,0179	0,3022
Frecuencia cardíaca (HR, pulsaciones min <sup>-1</sup> )	86,3	88,3	1,64	0,2766
Partición de la energía (kJ kg PM <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )				
EB ingerida	2810	2653	204,3	0,4680
EB heces	942	860	124,7	0,5339
ED ingerida	1868	1793	98,3	0,4693
EB metano	177	157	32,1	0,5571
EB orina	86	91	8,5	0,5486
EM ingerida	1606	1545	73,1	0,4334
Energía retenida en leche	551	577	40,0	0,5400
Producción de calor (kJ kg PM <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )				
HP medido	762	730	80,9	0,5524
HP predicho	1100	1007	80,0	0,2825
Residual de HP	- 338	- 277	107,8	0,5868

EB = energía bruta; ED = energía digestible; EM = energía metabolizable;

producción de calor = HP; residual de HP = HP medido – HP predicho; PM = peso metabólico: ALTA = 117,9, BAJA = 118,6,  $P = 0,4997$

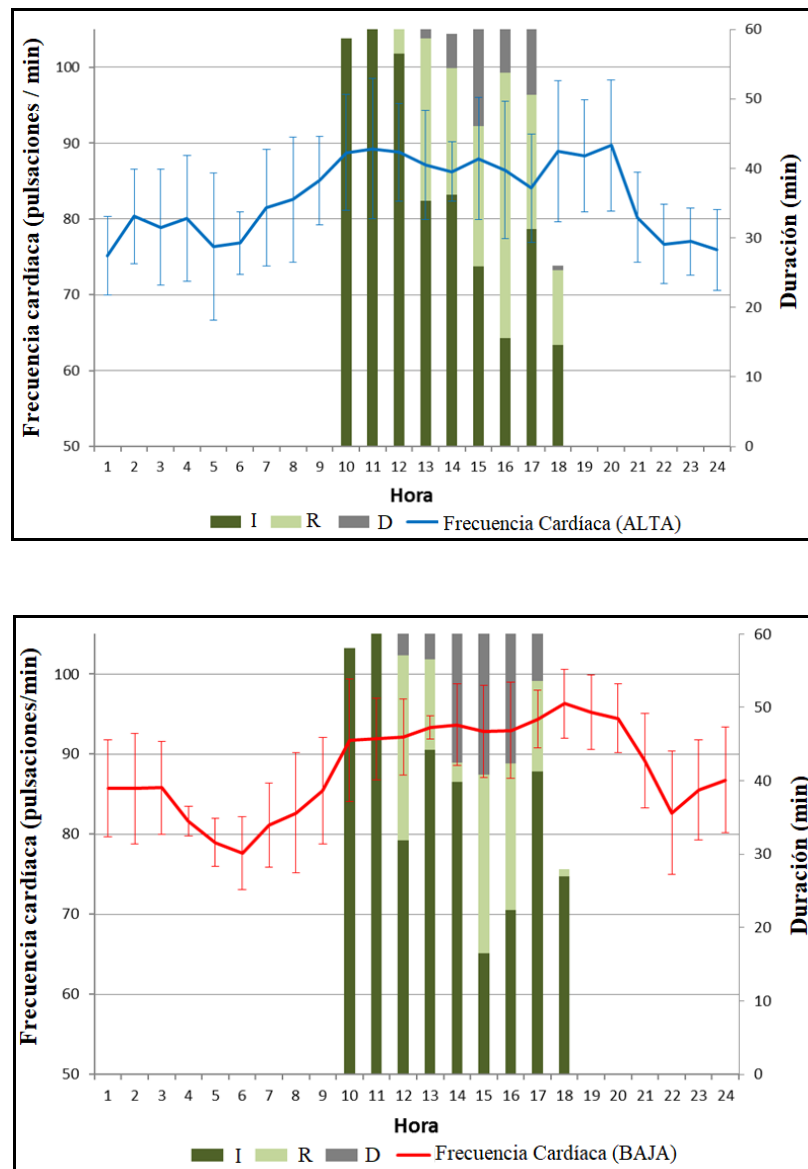
En la figura 8 se presenta la evolución de la frecuencia cardíaca a lo largo del día de las vacas pastoreando en pasturas con diferente biomasa. Los valores de frecuencia cardíaca para el tratamiento ALTA no difirieron significativamente con respecto al tratamiento BAJA en ninguna hora del día según las mediciones promedio de 4 días de registros para cada vaca.

**Figura 8.** Evolución diaria de la frecuencia cardíaca de las vacas pastoreando en pasturas con diferente biomasa



En la figura 9 se presenta la evolución de la frecuencia cardíaca y el comportamiento alimentario horario durante el período de observación para cada tratamiento.

**Figura 9.** Evolución de la frecuencia cardíaca y el comportamiento alimentario horario durante el período de observación de las vacas pastoreando en pasturas con diferente biomasa



Se observa un aumento de la frecuencia cardíaca en el período diurno, que pasa de valores de 77 pulsaciones  $\text{min}^{-1}$  a las 5:00, a valores de 88 (ALTA) y 95 (BAJA) pulsaciones  $\text{min}^{-1}$  a las 18:00.



#### **4. DISCUSIÓN**

Debido a que la asignación de forraje es un factor que afecta en mayor medida el consumo en pastoreo (Pérez Prieto y Delagarde, 2013), el efecto de la biomasa fue analizado a misma asignación de forraje. Esto se consiguió aumentando el área ofrecida en la pastura con menor biomasa por unidad de superficie (tratamiento BAJA). Las vacas recibieron 30 kg MS día<sup>-1</sup> por encima de la altura de corte de la pastura (5 cm), valores similares a los utilizados por Astigarraga *et al.* (2002) y Dini *et al.* (2012), de modo tal de no restringir el consumo por asignación de forraje por animal.

La biomasa ofrecida por encima de 5 cm difirió significativamente entre tratamientos, siendo mayor en 400 kg de MS ha<sup>-1</sup> y 11 cm más alta en promedio para el tratamiento ALTA. Las alturas de las pasturas (medida como lamina extendida) estuvieron dentro de los rangos reportados por Peyraud *et al.* (1996), Pérez-Prieto *et al.* (2012) y Dini *et al.* (2012), para pasturas similares.

Las variaciones entre los tratamientos estuvieron dentro de lo esperado, aunque estas diferencias fueron menores a lo previsto. Esto se debió principalmente a las variaciones climáticas registradas durante el mes de noviembre, durante los períodos experimentales. En términos promedio, durante el mes de noviembre 2015, las precipitaciones registradas por la Estación Meteorológica de Melo fueron mayores al promedio de los últimos 10 años (+ 26 mm; + 30%), mientras que las temperaturas medias se encontraron por debajo del promedio de los últimos 10 años (-1 °C). Sin embargo, los dos períodos experimentales del ensayo presentaron condiciones contrastantes: en P2 las temperaturas fueron mayores respecto al promedio mensual anual, y especialmente respecto a P1 (en particular, la TMax. alcanzada en P2 fue 3 °C mayor a P1). Además, las precipitaciones en P2 también fueron mayores a P1 (+ 21mm) (Cuadro 1). Estas particularidades climáticas estarían explicando el crecimiento acelerado de la pastura hacia la segunda mitad del experimento, lo que

pudo haber contribuido a reducir las diferencias esperadas entre tratamientos (Figura 6).

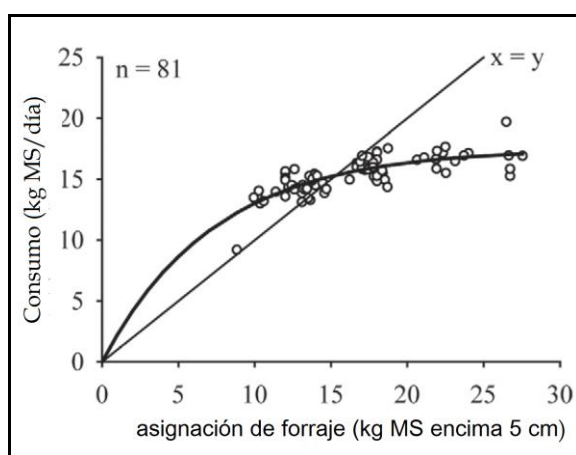
Independientemente de la diferencia en biomasa, la composición botánica y la composición química fueron similares entre tratamientos. Los valores de la composición química de la pastura en ambos tratamientos están de acuerdo con los valores presentados por otros autores para praderas similares en primavera (González y Astigarraga 2012, Dini *et al.* 2012, Orr *et al.* 2004). En particular, en la medida que la pastura estaba compuesta principalmente por dactilis (89% MS total era gramínea), es dable esperar una buena calidad de la pastura a pesar del avance de la primavera en la medida que esta especie florece relativamente tarde en la estación (mediados de noviembre en adelante) (García, 2003). En este sentido, cabe destacar que se logró diferenciar ambos tratamientos en cantidad de biomasa sin afectar la calidad. Se han encontrado pocos trabajos que estudien el efecto de la biomasa en relación a su disponibilidad a igual valor nutritivo (Peyraud *et al.* 1996). Varios autores reportan variaciones en el consumo de MS, producción de leche y rendimiento de metano a diferente biomasa, pero las pasturas también se diferenciaron en calidad (Muñoz *et al.* 2016, Wims *et al.* 2010, Stackelum y Dillon 2004).

La profundidad de defoliación fue de 21 cm en promedio, y el porcentaje de utilización fue 38 %. Este valor es bajo tomando en cuenta el consumo medido de las vacas en pastoreo, pero está en concordancia con lo reportado por Dini *et al.* (2012) para vacas lecheras con un consumo similar al medido en este experimento. Este bajo porcentaje de utilización estaría asociado a dificultades en la medición de la biomasa remanente post-pastoreo (Astigarraga, 1997), debido a la heterogeneidad del tapiz. Con respecto a la composición química del forraje consumido por las vacas era dable esperar que ésta fuese diferente a la composición del forraje ofrecido, ya que la altura del remanente resultó sustancialmente más alta (23 cm en promedio) que la altura de corte de la pastera (5 cm en promedio). Por lo tanto, un requisito para evaluar la calidad del defoliado fue estimar la composición química de esta fracción. En el

presente estudio, se tomó como muestra representativa del forraje defoliado, una submuestra compuesta por los estratos (estratos de 5 cm) situados entre la parte superior de los tallos y la altura media del remanente en cada tratamiento. Este análisis, permitió estimar que el forraje defoliado se componía principalmente de láminas (64 % MS total en promedio,  $P= 0,9038$ ) y que la composición química de esta fracción fue similar entre tratamientos y a su vez, no difirió estadísticamente de la composición química del forraje cortado por encima de 5 cm a excepción del contenido en FDA (Cuadro 2). La digestibilidad de la MO de la fracción defoliada presentó valores relativamente elevados (74 %), mayores a los reportados por Dini *et al.* (2012) en pasturas de primavera con vacas lecheras, pero muy similares a los presentados por González y Astigarraga (2012) para pasturas de dactilis en la misma época del año.

La biomasa diferente entre tratamientos (1859 vs 1447 kg MS ha<sup>-1</sup>,  $P = 0.0500$ ) no tuvo efecto sobre la cantidad de forraje consumido por las vacas y promedió 18,3 kg MS d<sup>-1</sup>. Esto podría estar explicado por la alta asignación de forraje por vaca de acuerdo a lo reportado por Peyraud *et al.* (1996), Tharmaraj *et al.* (2003), Pérez-Prieto y Delagarde (2013), quienes muestran que el consumo se acerca al máximo cuando la asignación es de 25 a 30 kg MS a<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> determinada a 5 cm o de 60 kg MS a<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> a ras del suelo (similar a los valores de asignación expresados a ras del suelo en este trabajo). Estos autores muestran respuestas que tienden a ser asintóticas por encima de estas asignaciones de forraje, tendiendo a una ingesta máxima de pasto y de producción de leche de aproximadamente 18 kg de MS d<sup>-1</sup> y 21 kg d<sup>-1</sup>, respectivamente. En este sentido, cabe resaltar que los valores de producción de leche hallados en este trabajo fueron de 20,6 kg LCGP d<sup>-1</sup> en promedio para ambos tratamientos, en coincidencia con lo reportado por Peyraud *et al.* (1996) y Pérez-Prieto y Delagarde (2013) para pasturas y animales de similares características (Figura 10).

**Figura 10:** Efecto de la asignación de forraje por encima de 5 cm sobre el consumo de vacas lecheras en pastoreo



Fuente: adaptado de Pérez-Prieto y Delagarde (2013)

Del mismo modo, el tiempo de pastoreo no difirió entre los tratamientos en las 9 horas de observación y fue de 324 min en promedio, el cual representó el 60 % del tiempo total de observación. Sin embargo, la frecuencia de bocados fue mayor en BAJA lo cual podría estar indicando una compensación por menor peso de bocado en este tratamiento. De acuerdo a la bibliografía (Gibb *et al.* 1997; Forbes 1988, Hodgson 1981), se espera que una menor biomasa por unidad de superficie, afecte de manera negativa el comportamiento alimentario. En este sentido, Gibb *et al.* (1997) encontraron que a una menor altura de la pastura los animales aumentaban su tiempo de pastoreo, así como el número de bocados diarios, como estrategia de compensación ante la reducción de la velocidad de consumo, si bien éste podría verse limitado por los requerimientos de rumia, influenciados por la cantidad y calidad de la pastura consumida. Otra interpretación es dada por Tharmaraj *et al.* (2003). Estos autores atribuyen la diferencia en la frecuencia de bocado a la

necesidad de masticar más cuanto mayor es el peso de bocado en pasturas con mayores alturas de tapiz (el peso promedio del bocado aumenta con la altura de la pastura al aumentar la profundidad de defoliación en cada bocado), lo cual insume un mayor tiempo por bocado. Por lo tanto, el tiempo más largo requerido para masticar bocados más pesados explica el aumento en el tiempo entre bocados de prehensión sucesivos para las vacas que pastorean en pasturas más altas. En base a esta interpretación, se puede estimar un tiempo de 1,7 segundos bocado<sup>-1</sup> en ALTA en comparación a 1,4 segundos bocados<sup>-1</sup> en BAJA. Observaciones en términos de los movimientos de masticación requeridos para acomodar el bolo previo a ser tragado en pasturas altas también ha sido reportado por Astigarraga y Peyraud (1995), Peyraud *et al.* (1996) y Stakelum y Dillon (2004).

Los valores de emisión de CH<sub>4</sub> entérico no difirieron entre tratamientos, siendo 363 g d<sup>-1</sup> en promedio, en acuerdo con los reportados por Muñoz *et al.* (2016), Westberg *et al.* (2001), y a nivel nacional por Dini *et al.* (2012), los cuales están en el rango de 345-388 g CH<sub>4</sub> d<sup>-1</sup> para vacas lecheras en pasturas de calidad similar y consumos próximos a los reportados en este trabajo. Finalmente, se obtuvo un rendimiento de CH<sub>4</sub> como proporción de la EB ingerida (Y<sub>m</sub>) de 7,0 % en promedio, en acuerdo con valores reportados para Nueva Zelanda (Lassey 2007, Boadi y Wittenberg 2002), para Chile (Muñoz *et al.* 2016), y para Uruguay (Dini *et al.* 2012).

El análisis del gasto energético se realizó a partir de la técnica de Brosh *et al.* (1998) (HP medido). Este método estima el HP mediante la relación O<sub>2</sub>P-HR. En vacas lecheras, el HP y HR se ven afectados principalmente por el consumo de EM, el nivel de producción, y los estados reproductivos y fisiológicos, y no tanto por el ejercicio ya que las actividades de vacas lecheras rara vez involucran una intensa actividad física durante una parte importante del día. En este trabajo, se registraron dificultades para la medición del volumen de O<sub>2</sub> de los animales en P1. En base a esto, y tomando en cuenta la duración del experimento (20 días en total), se estimó el HP por el O<sub>2</sub>P determinado al inicio de P2 multiplicado por la HR medida en cada período. Los valores de HP así calculados no difirieron entre tratamientos.

Relacionando los valores de HR con el comportamiento alimentario (Figura 9), se observa que los valores de HR son mínimos a las 5:00, y aumentan luego de las 10:00 y hacia la tarde, en acuerdo con el período de mayor actividad de ingestión. Resultados similares son reportados por Brosh *et al.*, (1998), quienes registraron incrementos en la HR cuando se incrementó la ingestión asociado a un aumento de la EM ingerida.

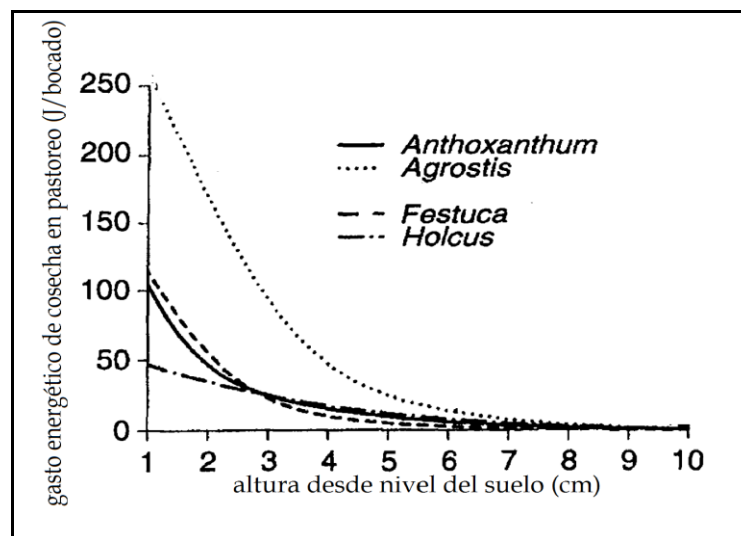
También se realizó la estimación de HP (HP predicho) a partir del análisis de la partición de la energía ingerida por los animales (EB ingerida) y las diferentes pérdidas energéticas (EB heces, EB orina, EB metano) hasta alcanzar la Energía Metabolizable (EM) y la Energía Retenida (ER) para producción de leche (suponiendo la energía retenida en tejido despreciable en función de las variaciones de pesos observadas durante el ensayo). No hubo diferencias entre tratamientos en los valores de HP predicho ( $1053 \text{ kJ kg PM}^{-1}$ , en promedio), pero el residual HP fue alto ( $-307 \text{ kJ kg PM}^{-1}$ , en promedio).

Para poder analizar esta diferencia, es importante primeramente validar la estimación de la EM ingerida por el método de partición de la energía. Tomando como referencia una energía de mantenimiento de  $293 \text{ kJ kg PM}^{-1}$  (INRA, 1989), y suponiendo que la energía retenida en tejido es despreciable en función de las variaciones de peso observadas durante el ensayo, la energía retenida (producción + mantenimiento) en promedio, fue  $857 \text{ kJ kg PM}^{-1}$ , lo cual representa 54,4 % de la EM ingerida estimada por el método de partición. Sin embargo, según Vermorel y Coulon (1992), para este tipo de dieta sería esperable un rendimiento de la EM en el entorno del 60%. Por lo tanto, es posible que la EM ingerida estimada en este trabajo haya sido sobreestimada un 10 % aprox. ( $857 \text{ kJ kg PM}^{-1} / 0,60 = 1428 \text{ kJ kg PM}^{-1}$ ). En función de esto, se podría recalcular el HP predicho, resultando un valor de  $864 \text{ kJ kg PM}^{-1}$ , el cual se encuentra en el rango de valores reportados por Jasisnsky *et al.* (2016) para vacas lecheras.

Por lo expuesto previamente, es posible que el HP medido esté subestimado para animales de estas características, lo cual podría estar asociado a un valor de O<sub>2</sub>P bajo medido en este ensayo.

Finalmente, si hubo un efecto de la biomasa sobre el comportamiento alimentario (frecuencia de bocados), éste no se manifestó en un HP por actividad diferente entre tratamientos. Según Thamaraj *et al.* (2003), en pasturas templadas, con altura o biomasa no limitante como resultó finalmente para este experimento, la eficiencia en términos de peso por unidad de energía cosechada en el proceso de prehensión es mayor en tapices más altos que en tapices más bajos pero el tiempo de prehensión por bocado aumenta, lo cual también demanda mayor energía por masticación. En tapices más bajos, con menor biomasa, la energía cosechada por bocado es menor, pero también es menor la energía asociada a la masticación para preparar el bolo, por lo cual el menor gasto de energía en este proceso puede compensar el menor peso de bocado (o menor energía cosechada por bocado). Illius *et al.* (1995) reportan un gasto energético por bocado de menos de 25 J por encima de 5 cm (Figura 11).

**Figura 11:** Energía de cosecha (J/bocado) según el perfil de la distribución vertical de la biomasa de cuatro gramíneas



Fuente: Illius *et al.* (1995)

Utilizando este valor, el gasto energético por actividad de cosecha sería de aprox. 288 a 340 kJ a<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> (ALTA y BAJA respectivamente) durante el período de observación del comportamiento de 9 horas. Por lo cual, Illius *et al.* (1995) concluyen que, en pasturas templadas, con biomasa no limitante (por encima 5 cm), el costo de cosecha es ínfimo frente a la energía cosechada en cada bocado, en acuerdo con los resultados de Di Marco *et al.* (1996).

Sin embargo, en otras condiciones a las evaluadas en este trabajo, como por ejemplo, diferencias en la distribución espacial de la biomasa (heterogeneidad) que obliguen a una mayor búsqueda y caminata, o diferencias en la calidad de la pastura que impliquen mayor fuerza de prehensión, podrían demandar estrategias de comportamiento en pastoreo más desafiantes para alcanzar un consumo determinado con consecuencias en el GE por actividad extra en pastoreo.



## **5. CONCLUSIONES**

Los rangos de biomasa pre-pastoreo evaluados en este trabajo no afectaron el consumo, ni la producción de leche, ni la emisión unitaria de metano de vacas lecheras en pastoreo, asociado a una asignación de forraje estimada a 5 cm que resultó próxima a la oferta de forraje que permite expresar el máximo consumo voluntario en pastoreo para animales de estas características.

A pesar de que el consumo no fue afectado, las vacas pastoreando el tratamiento con menor biomasa (expresada por encima 5 cm) adaptaron su comportamiento por medio de una mayor frecuencia de bocados, aunque esto no estuvo acompañado por un aumento del tiempo de pastoreo durante el tiempo de observación de los animales en este trabajo. El costo energético de prehensión de los bocados es muy bajo en pasturas templadas con alta digestibilidad, por lo cual la diferencia en costo energético por mayor número de bocados en este tratamiento, no se tradujo en diferencias significativas en términos de gasto energético por actividad extra de pastoreo.

Es posible que, a menores asignaciones diarias de forraje, los animales expresen adaptaciones del comportamiento para alcanzar altos consumos que sean mediadas por la biomasa y altura de la pastura con consecuencias en la eficiencia de cosecha y en el gasto energético por actividad de pastoreo, lo cual no se pudo poner en evidencia en este trabajo por la asignación de forraje utilizada (30 kg MS por encima de 5 cm vaca<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>).

## **6. BIBLIOGRAFÍA**

- Aharoni Y, Brosh A, Kafchuk E. 2006. The efficiency of utilization of metabolizable energy for milk production: a comparison of Holstein with F1 Montbeliarde × Holstein cows. *Animal Science*, 82: 101-109.
- Allden WG, McDWhittaker IA. 1970, The determinants of herbage intake by grazing sheep the interrelationship of factors influencing herbage intake and availability. *Australian Journal of Agricultural Research*, 21(5):755-766.
- AOAC. (Association of Official Analytical Chemists) 1990. *Official Methods of Analysis*, 15th ed. Virginia (NV), AOAC, USA. pp.770-771.
- Astigarraga L. 2004. Modelo de decisión lechero: análisis de alternativas productivas. *Intensificación en lechería: la alternativa rentable*. (pp. 24-32). Montevideo, Uruguay: INIA-FUCREA-FAGRO. FPTA 101.
- Astigarraga L., Peyraud J.L., Delaby L. 2002. Effect of level of the nitrogen fertilization and the protein supplementation on the herbage intake and the nitrogen balance of grazing dairy cows. *Animal Research*, 51: 1-15.
- Astigarraga L. 1997. Técnicas para estimar el consumo de rumiantes en pastoreo. In: *Workshop "Pastagem volvida para a Nutrição Animal"*. Universidade Estadual de Maringá. Paraná, Brasil. 1-23.
- Astigarraga L, Peyraud JL. 1995. Effects of sward structure upon herbage intake by grazing dairy cows. *Annales de Zootechnie*. 44: 126.
- Brosh A. 2015. Heart rate O<sub>2</sub> pulse method for measuring heat production: from theory to application. In: *Eficiencia energética de rumiantes en pastoreo*. Facultad de Agronomía.
- Brosh A. 2007. Heart rate measurement as an index of energy expenditure and energy balance in ruminants: a review. *Journal of Animal Science*, 85:1213–1227.
- Brosh A, Henkin Z, Ungar ED, Dolev A, Orlov A, Yehuda Y, Aharoni Y. 2006. Energy cost of cows' grazing activity: Use of the heart rate method and the Global Positioning System for direct field estimation. *Journal of Animal Science*, 84:1951-1967.

- Brosh A, Aharoni Y, Shargal E, Sharir B, Gutman M, Choshniak I. 2004. Energy balance of grazing beef cattle in Mediterranean pasture, the effects of stocking rate and season 2. Energy expenditure as estimated from heart rate and oxygen consumption, and energy balance. *Livestock Production Science* 90: 101–115.
- Brosh A, Aharoni Y, Degen A, Wright D, Young BA. 1998. Estimation of energy expenditure from heart rate measurements in cattle maintained under different conditions. *Journal of Animal Science*, 76: 3054–3064.
- Boadi DA, Wittenberg KM. 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.
- Combellas J, Hodgson J. 1979. Herbage intake and milk production by grazing dairy cows. 1. The effects of variations in herbage mass and daily herbage allowance in a short-term trial. *Grass Forage Science*.34: 209-214.
- Comeron E, Peyraud J. 1993. Prediction of herbage digestibility ingested by dairy cows. *Revista Argentina de Producción Animal*, 13: 23-30.
- Delagarde R, Peyraud JL, 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.
- Di Marco ON, Aello MS. 2003. Gasto energético de la actividad de vacunos en pastoreo y su efecto en la producción. Sitio argentino de producción animal. [En línea]. Consultado el 4 agosto 2017. Disponible en: [http://www.produccion-animal.com.ar/informacion\\_tecnica/manejo\\_del\\_alimento/01-costo\\_energetico\\_de\\_actividad\\_en\\_pastoreo\\_efecto.pdf](http://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/manejo_del_alimento/01-costo_energetico_de_actividad_en_pastoreo_efecto.pdf)
- Di Marco ON, Aello MS. 2001. Energy expenditure due to forage intake and walking of grazing cattle. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia*. 53 (1):105-110.
- Dini Y, Gere J, Briano C, Manetti M, Juliarena P, Picasso V, Astigarraga L. 2012. Methane emission and milk production of dairy cows grazing pastures rich in legumes or rich in grasses in Uruguay. *Animal*. 2 (2): 288-300.

- Dohme-Meier F, Kaufmann LD, Görs S, Junghans P, Metges CC, Van Dorland HA, Bruckmaier RM, Munger A. 2014. Comparison of energy expenditure, eating pattern and physical activity of grazing and zero-grazing dairy cows at different time points during lactation, *Livestock Science*. 162: 86-96.
- Faverdin P, Delaby L, Delagarde R. 2007. L'ingestion d'aliments par les vaches laitières et sa prévision au cours de la lactation. *INRA Productions Animales*. 20 (2), 151-162.
- Forbes TDA. 1988. Researching the Plant-Animal Interface: The investigation of Ingestive Behavior in Grazing Animals. *Journal of Animal Science*, 66: 2369-2379.
- García J. 2003. Crecimiento y calidad de gramíneas forrajeras en La Estanzuela. Montevideo: INIA. Serie técnica (133).. 19p.
- Gerber PJ, Steinfeld H, Henderson B, Mottet A, Opio C, Dijkman J, Tempio G. 2013. Tackling climate change through livestock: A global assessment of emissions and mitigation opportunities. Rome, Italy, FAO. [En línea] Consultado 8 de octubre 2016. Disponible en: [www.fao.org/docrep/018/i3437e/i3437e.pdf](http://www.fao.org/docrep/018/i3437e/i3437e.pdf)
- 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.
- Gibb MJ, Huckle CA, Nuthall R, Rook AJ. 1997. Effect of sward surface height on intake and grazing behaviour by lactating Holstein Friesian cows. *Grass and Forage Science*. (52): 309–321.
- González P, Astigarraga L. 2012. Productividad de vacas lecheras en pasturas de festuca o de dactilis. *Agrociencia Uruguay*. 16: 160 – 165.
- Hodgson J. Plants for grazing systems. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production* 1990. 50: 29-34.
- Hodgson J. The control of herbage intake in the grazing ruminant. *Proceedings of the Nutrition Society* 1985. 44: 339-346.

- Hodgson J. 1981. Variations in the surface characteristics of the sward and the short-term rate of herbage intake by calves and lambs. *Grass and Forage Science*, 36 (1):49-57.
- Hodgson J, Wilkinson JM. 1968. The influence of the quantity of herbage offered and its digestibility on the amount eaten by grazing cattle. *Journal of Brazilian Grass Society*. 23: 75-80.
- Hughes TP, Sykes AR, Poppi DP, Hodgson J. The influence of sward structure on peak bite force and bite weight in sheep. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production* 1991. 51: 153-158.
- IDF., 2010. (International Dairy Federation). A Common Carbon Footprint for Dairy, The IDF Guide to Standard Lifecycle Assessment Methodology for the Dairy Industry. [En línea] Consultado 10 de diciembre 2015. Disponible en: <http://www.idf-lca-guide.org/Files/media/Documents/445-2010-A-common-carbonfootprint-approach-for-dairy.pdf>
- Illius AW, Gordon IJ, Milne JD, Wright W. 1995. Costs and Benefits of Foraging on Grasses Varying in Canopy Structure and Resistance to Defoliation. *Functional Ecology*. 9 (6): 894-903
- INRA (Institut National de la Recherche Agronomique). 1989. Ruminant nutrition. Recommended allowances and feed tables. Montrouge, France: Institut National de la Recherche Agronomique, John Libbey Eurotext. 389 p.
- IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change). 2006. Guidelines for National Greenhouse Gas Inventories: Agriculture, forestry and other land use. In H. Dong J, Mangino T, McAllister A, Hatfield JL, Johnson DE, Romanovskaya A. Emissions from livestock and manure management. Hayama, Kanawaga, Japan: IGES. Consultado el 5 de marzo de 2016. Disponible en: [http://www.nggip.iges.or.jp/public/2006gl/pdf/4\\_Volume4/V4\\_10\\_Ch10\\_Livestock.pdf](http://www.nggip.iges.or.jp/public/2006gl/pdf/4_Volume4/V4_10_Ch10_Livestock.pdf)
- Jasinsky AM, Ceriani M, Espasandin AC, Mattiauda DA, Carriquiry M. 2016. Heat production of primiparous Holstein cows with different feeding strategies during early lactation. En: *Proceedings Congresso da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 53ª Reunião, 2016 Gramado – RS.*

- Johnson K, Johnson D. 1995. Methane emissions from cattle. *Journal of Animal Science*. 73: 2483-2492.
- Johnson K, Huyler M, Westberg H, Lamb B, Zimmerman P. 1994. Measurement of methane emissions from ruminant livestock using a SF<sub>6</sub> tracer technique. *Environmental Science Technology*. 28: 359–362.
- Laca EA, Distel RA, Griggs TC, Deo G, Demment MW. 1993. Test of optimal foraging with cattle: The marginal value theorem successfully predicts patch selection and utilisation. En: *Proceedings of the XVII International Grassland Congress, 8-21 February 1993, Palmerston North, New Zealand, Hamilton, New Zealand, Lincoln, New Zealand, Rockhampton, Australia*. New Zealand Grassland Association . 709-710.
- Lassey KR. 2007. Livestock methane emission: From the individual grazing animal through national inventories to the global methane cycle. *Agricultural and Forest Meteorology*. 142: 120-132.
- Le Du YLP, Combellas J, Hodgson J, Baker RD. 1979. Herbage intake and milk production by grazing dairy cows. 2. The effects of level of winter feeding and daily herbage allowance. *Grass and Forage Science* 34: 249-260.
- Littel R, Pendergast J, Natarajan R. 2000, Modelling covariance structure in the analysis of repeated measures data. *Statistics in Medicine*, 19: 1793-1819.
- Lizarralde C, Picasso V, Rotz CA, Cadenazzi M, Astigarraga L. 2014. Practices to reduce milk carbon footprint on grazing dairy farms in southern Uruguay: Case studies. *Sustainable Agriculture Research*, 2 (3): 1-15.
- Lorenzen T, Anderson V. 1993. *Design of Experiments: a No-name Approach*. Dekker M. (Ed.). New York, United States. CRC Press. 414 p.
- Martin C, Doreau M, Morgavi D. 2008. Methane mitigation in ruminants: from rumen microbes to the animal. [En línea] Consultado 5 de marzo de 2016. Disponible en:  
[http://www.animalbytes.org/wpcontent/uploads/2009/06/edition\\_2\\_lgccmartin.pdf](http://www.animalbytes.org/wpcontent/uploads/2009/06/edition_2_lgccmartin.pdf)
- Miron J, Adin G, Solomon R, Nikbachat M, Zenou A, Yosef E, Brosh A, Shabtay A, Asher A, Gacitua H, Kaim M, Yaacobi S, Portnik Y, Mabweesh S J. 2010.

- Effects of feeding cows in early lactation with soy hulls as partial forage replacement on heat production, retained energy and performance. *Animal Feed Science and Technology* 155: 9–17.
- Muñoz C, Letelier PA, Ungerfel EM, Morales JM, Hub S, Pérez-Prieto LA. 2016. Effects of pregrazing herbage mass in late spring on enteric methane emissions, dry matter intake, and milk production of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 99: 7945–7955.
- Nicol AM, Young BA. 1990, Short-term thermal and metabolic responses of sheep to ruminal cooling: effects of level of cooling and physiological state. *Canadian Journal of Animal Science*, 70: 833–843.
- NRC. (National Research Council) 2001. Nutrient requirements of dairy cattle. 7th Revised Edition, Subcommittee on Dairy Cattle Nutrition, Committee on Animal Nutrition, Board on Agriculture and Natural Resources, National Research Council. National Academy Press, Washington, D.C.
- Orr RJ, Rutter SM, Yarrow NH, Champion RA, Rook AJ. 2004. Changes in ingestive behaviour of yearling dairy heifers due to changes in sward state during grazing down of rotationally stocked ryegrass or white clover pastures. *Applied Animal Behaviour Science*, 87: 205–222.
- Parga J, Peyraud JL, Delagarde R. 2000, Effect of sward structure and herbage allowance on herbage intake by grazing dairy cows. En: A.J. Rook, P.D. Penning (Eds), *Grazing management: The principles and practice of grazing for profit and environmental gain in temperate grassland system*. British Grassland Society, Occasional Symposium. 34, 61-66.
- Penning PD, Parsons AJ, Orr RJ, Hooper GE. 1994. Intake and behavior response by sheep to changes in sward characteristics under rotational grazing. *Grass and Forage Science*, 49: 476-486.
- Penning PD. 1986. Some effects of sward conditions on grazing behaviour and intake by sheep. En: Gudmundsson, Ed. *Grazing Research at Northern Latitudes*. New York. Plenum Press. 219-226.

- Pérez-Prieto LA, Delagarde R. 2013. Meta-analysis of the effect of pasture allowance on pasture intake, milk production, and grazing behavior of dairy cows grazing temperate grasslands. *Journal of Dairy Science*. 96: 6671–6689.
- Pérez-Prieto LA, Peyraud JL, Delagarde R. 2012. Does pre-grazing herbage mass really affect herbage intake and milk production of strip-grazing dairy cows? *Grass and Forage Science*. 68: 93-109.
- Peyraud JL, Delaby L. 2005. Combiner la gestion optimale du pâturage et les performances des vaches laitières: enjeux et outils. *INRA Productions Animales*. 18 (4), 231-240.
- Peyraud JL, Comeron EA, 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.
- Poppi DP, Hughes TP, L'Huillier PJ. 1987. Intake of pasture by grazing ruminants. En: Nicol, A.M. ed. *Livestock feeding on pasture*. Hamilton, New Zealand Society of Animal Production. Publicación Ocasional, 10: 55- 64.
- Roca-Fernández AI, O'Donovan MA, Curran J, González – Rodriguez A. 2011. Effect of pre-grazing herbage mass and daily herbage allowance on perennial ryegrass swards structure, pasture dry matter intake and milk performance of Holstein-Friesian dairy cows. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 9(1): 86-99.
- SAS Institute Inc. 2001. Release 7.00, Cary, NC, USA.
- Stakelum G, Dillon P. 2004. The effect of herbage mass and allowance on herbage intake, diet composition and ingestive behaviour of dairy cows. *Irish Journal of Agricultural and Food Research*, 43: 17–30
- Street JC, Butcher JE, Harris LE. 1964. Estimating urine energy from urine nitrogen. *Journal of Animal Science*, 23:1039–1041.
- Thanner S, Dohme-Meier S, Görs S, Metges C, Bruckmaier RM, Schori F. 2014. The energy expenditure of 2 Holstein cow strains in an organic grazing system. *Journal of Dairy Science*, 97: 2789–2799.
- Tharmaraj J, Wales WJ, Chapman D F, Egan AR. 2003. Defoliation pattern, foraging behaviour and diet selection by lactating dairy cows in response to sward



- height and herbage allowance of a ryegrass-dominated pasture. *Grass and Forage Science*. 58, 225–238.
- Van Soest P, Roberston J, Lewis B. 1991. Methods for dietary fiber neutral detergent fiber and non starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*. 74 (5):3583 - 3597.
- Vermorel M, Coulon JB. 1992. Alimentation des vaches laitières: Comparaison des systèmes d'alimentation énergétique. *INRA Productions Animales* 5 (4): 289 - 298
- Wade MH, Carvalho PCdeF. 2000. Defoliation patterns and herbage intake on pastures. En *Grassland Ecophysiology and Grazing Ecology*. Eds. Lemaire G, Hodgson J, Moraes A de, Nabinger C, Carvalho PCdeF. Wallingford, Oxon: CAB International. 233-248.
- 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 of Agricultural Science*. 59: 381-385.
- Wims CM, Deighton MH, Lewis E, O'Loughlin B, Delaby L, Boland TM, O'Donovan M. 2010. Effect of pre-grazing herbage mass on methane production, dry matter intake, and milk production of grazing dairy cows during the mid-season period. *Journal of Dairy Science*. 93 (10): 4976-4985.

## **7. ANEXOS**

### **7.1. ANEXO 1**

**Artículo: Effect of herbage biomass on intake, energy expenditure and methane emissions of dairy cows grazing at different biomass**

**Cecilia Loza<sup>1\*</sup>, José Gere<sup>2</sup>, María Soledad Orcasberro<sup>1</sup>, Paula Juliarena<sup>3</sup>,  
Alberto Casal<sup>1</sup>, Mariana Carriquiry<sup>1</sup> and Laura Astigarraga<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Departamento de Producción Animal y Pasturas, Facultad de Agronomía,  
Universidad de la República, Av. Garzón 780, Montevideo 12900, Uruguay

<sup>2</sup> Unidad de Investigación y Desarrollo de las ingenierías, UTN.BA, Facultad  
Regional de Buenos Aires, CONICET. Medrano 951 (C117AAQ) C.A.B.A.  
Argentina;

<sup>3</sup> IFAS, Facultad de Ciencias Exactas, UNCPBA, CONICET, Pinto 399, Tandil 7000,  
Argentina

\* Author to whom correspondence should be addressed

E-Mail: cloza@fagro.edu.uy (C.L.);

Tel.: +598 2 354 34 60

**Simple Summary:** Ruminants have been questioned for their contribution to climate change due to enteric methane emission. In grazing systems, production efficiency depends mainly on the use of pastures. Free grazing cattle have an extra daily maintenance requirement due to the demand of energy for the physical activities of forage intake and walking. In low biomass pastures, the extra energy expenditure (HP) per activity could reach 25 to 30%, due to the cost of grazing, which should result in an increase in methane emissions per liter of milk produced and Carbon Footprint (CF). Here, we quantified the effect of biomass at the same herbage allowance on energy expenditure, daily methane emission and fat and protein corrected milk yield of grazing dairy cows.

**Abstract:** The aim of this study was to quantify the effect of biomass on energy expenditure, methane emissions and FPCM of grazing dairy cows. Treatments were two contrasting pre-grazing biomass (LHM vs HHM) at a daily HA of 30 kg DM (above 5 cm). Eight multiparous Holstein cows, were used in a 2×2 Replicated Latin Square design. DMI was estimated using Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and digestibility by faecal index (N and ADF). Grazing time was determined by observation between milkings (9 h). HP was estimated from heart rate and O<sub>2</sub> pulse, CH<sub>4</sub> was determined using the SF<sub>6</sub> tracer technique. Pre-grazing herbage height and biomass above 5 cm differed significantly (48 vs. 37 cm, P = 0.0374; 1859 vs. 1447 kg DM ha<sup>-1</sup>; P = 0.0500, respectively). However, DMI (18.3 kg d<sup>-1</sup>; P = 0.5101), grazing time (324 min; P = 0.6522), and HP (725 kJ kg MW<sup>-1</sup>, P = 0.5694) were similar among treatments, therefore, FPCM and CH<sub>4</sub> yield were also similar (20.6 kg d<sup>-1</sup>, P = 0.7527; 21 g kg DM<sup>-1</sup>, P = 0.7115, respectively). In the current study, biomass in the LHH sward was higher than attempted, that would explain the lack of differences in daily intake and HP at grazing, and therefore milk production and CH<sub>4</sub> yield among treatments.

**Keywords:** dairy; biomass; intake; energy expenditure; methane emissions

## 1. Introduction

Ruminants have been questioned for their contribution to climate change due to enteric methane (CH<sub>4</sub>) emissions [1]. In low input grazing systems, the efficiency of production highly depends on the use of pastures. National research has shown that an increase in concentrate supply without an efficient use of pastures does not contribute to reduce Carbon Footprint (CF) [2]. That effect is the result of low pasture intake, as a consequence of low yielding pastures [3]. Grazing animals have an extra daily maintenance requirement due to the demand of energy for the physical activities of forage intake and walking, which would explain the lower productivity of grazing systems, compared with confined animals [4]. In low biomass pastures, the extra energy expenditure per activity could reach 25 to 30 %, due to the cost of grazing, which should result in an increase in methane emissions per liter of milk produced and CF. For Uruguay, with predominant pasture based dairy systems, it is important to adjust management practices that lead to an increase in milk production and therefore, a reduction in CF. The aim of the present study was to quantify the effect of biomass at the same herbage allowance on intake, energy expenditure, daily methane emission and fat and protein corrected milk yield of grazing dairy cows.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Experimental treatments and design

The experiment was carried out in “Bernardo Rosengurt” research station, Universidad de la República, Uruguay (32°22'S, 54°26'W), during November 2015 (spring), on a *Dactylis glomerata* and *Medicago sativa* based pasture. Treatments consisted of two contrasting pre-grazing herbage biomass: low herbage mass (LHM) and high herbage mass (HHM). A 2 × 2 Replicated Latin Square design was implemented to evaluate the two treatments. Eight multiparous Holstein dairy cows in mid lactation were used, in two periods (5 days of adaptation followed by 5 days of measurements). Animals were assigned to the treatments based on their initial

milk production ( $21.1 \pm 0.5$  kg d<sup>-1</sup>), days of lactation ( $190 \pm 12.4$ ) and live weight ( $536.8 \pm 12.9$  kg).

## 2.2. *Herbage measurements*

The experimental grazing area comprised 8 ha of a dactylis (*Dactylis glomerata*) and alfalfa (*Medicago sativa*) based sward, which was cut 35 days prior to the experimental period, at a 10 cm height above ground level. For the determination of the treatments, it was divided with electric fence in two subplots, allocating 30% of the area for the HHM treatment, while the remaining area constituted the LHM treatment. The pasture in HHM was not cut again, while in LHM an additional cut was made (10 cm above the ground level), 15 days before the beginning of the experiment. The objective of the differential cuts between pastures was to reach contrasting biomass, depending on their height (the target height for HHM was 30 - 35 cm, while on LHM it was intended to reach a height of 15 - 20 cm measured on extended sheet).

Pasture allowance was the same for the animals in both treatments (30 kg DM a<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> above 5 cm), during the two experimental periods. The cows grazed in daily strips, and the surface area of each strip was calculated based on the available forage and the established daily allowance. After morning milking, the animals entered a new strip.

Pre-grazing herbage biomass and mean sward height were measured for each treatment of each experimental period. Herbage biomass was estimated by harvesting three strips (10 m × 0,5 m) with a motor scythe at a cutting height of 5 cm. Herbage biomass below the motor scythe cutting height was determined by two samples cut within the frame of a 0.3 m × 0.3 m quadrat on each strip. Herbage samples were weighed fresh, sampled, and approximately 500 g were dried at 60 °C for 48 h for DM determination and for subsequent chemical analysis of offered forage. Each time, 50 tillers were taken randomly and the extended height was measured to estimate the mean sward height before grazing. The same procedure was followed

for determination of post-grazing herbage mass and sward height after grazing. On the same days as for the determination of pre-grazing herbage mass, three handfuls of herbage were cut at ground level with scissors on the edge of each strip, to determine the proportion of legume and grass of the herbage offered. The proportion of legume and grass in the total DM herbage mass was determined by manual separation from a first sub-sample prior to drying. The second sub-sample, with its original structure still preserved, was cut at a height corresponding to the mean post-grazing sward height to determine chemical composition of defoliated herbage.

### 2.3. Animal measurements

Individual herbage OM intake was determined using chromic oxide ( $\text{Cr}_2\text{O}_3$ ) to estimate faecal organic matter (OM) output, and Nitrogen (Nf) and acid detergent fiber (ADFf) contents in the faeces ( $\text{g kg OM}^{-1}$ ) to estimate OM digestibility (OMd) of ingested herbage, according to the equation established by Comeron and Peyraud [5] for herbage-based diets without supplements. Concentrate pellets containing chromic oxide (*ca.* 20 g  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  per day) were offered twice a day in two equal portions of 200 g each, at milking, starting on day one of the experimental period to achieve a ruminal balance. Faeces were rectal-sampled after morning milking and after evening milking and oven dried at 60 °C over 72 h in order to measure the dry matter, the chrome concentration, and the chemical composition.

Grazing and ruminating time, and biting rate were determined at the grazing session between milking (9:00 to 18:00). Individual milk production was measured each day. Milk fat and protein contents were determined on four consecutive days, in each experimental period. Cows were weighed on the first and the last day of each experimental period.

$\text{CH}_4$  emission was measured using the  $\text{SF}_6$  tracer technique reported by Johnson and Johnson [6] adapted by Gere y Gratton [7]. Seven days before the beginning of the experiment, a  $\text{SF}_6$  permeation tube was introduced *per os* into the

rumen of each animal. The breath gas sampling system consisted of a 0.5 L stainless steel collecting vessel, a ball-bearing inflow restrictor adjusted to accumulate 0.5 bar of air sample during a 5-day period and a short tube used to connect both. The inflow restrictor was located above the animal's nostrils and protected against water and dust by means of a double filter reported by Gere and Gratton [7]. Two collecting vessels were fitted to each animal's head by means of especially designed halters. Immediately prior to the sampling period, each collecting vessel was evacuated (< 0,5 mb) after cleaning with high purity nitrogen gas (N<sub>2</sub>). The breath gas samples were measured over a period of five days during each period. Additionally, an identical set as used with the cows was used to collect background air samples during each 5-day period. The breath gas samples collected were analyzed immediately after the end of the experimental period. Daily CH<sub>4</sub> emissions were calculated from SF<sub>6</sub> release rate and CH<sub>4</sub>/SF<sub>6</sub> ratio of concentrations in breath samples, after correction for background gas concentrations according to the equation suggested by Gere y Gratton [7]:  $CH_4 \text{ (g d}^{-1}\text{)} = PRSF_6 \times [CH_4] / [SF_6]$  where: *PRSF6* is the SF<sub>6</sub> permeation rate from the PT and *[CH<sub>4</sub>]* and *[SF<sub>6</sub>]* are the concentration of these gases (ppm y ppt, respectively) above atmospheric concentration.

Energy expenditure (as heat production: HP) from grazing and walking activities, was estimated using the heart rate and O<sub>2</sub> pulse method reported by Brosh *et al.* [8]. The heart rate (HR) was recorded by means of Heart Rate Radiotransmitters, fitted to the thorax of each animal, behind the forelegs by specifically designed belts, for 4 days in each experimental period. At the beginning of each experimental period the O<sub>2</sub> pulse was calculated by simultaneously measuring heart rate and O<sub>2</sub> consumption. O<sub>2</sub> consumption was measured using an open respiratory system with mask, as described by Brosh *et al.* [8] according to the following equations:  $Daily\ HP \text{ (MJ cow}^{-1}\text{ day}^{-1}\text{)} = specific\ HP \text{ kg BW}^{0,75}$

where:  $specific\ HP \text{ (KJ kg BW}^{0,75}\text{ }^{-1}\text{ day}^{-1}\text{)} = HR \times O_2P \times 20,47 / 1000 \times 60 \times 24$ ; *HR* = heart rate (beats min<sup>-1</sup>); *O<sub>2</sub>P* = mL of O<sub>2</sub> / (beat × kgBW<sup>0,75</sup>); 20,47 = O<sub>2</sub> consumption (KJ LO<sub>2</sub><sup>-1</sup>) [9].

The HP measured by this method was compared with the HP value predicted based on the DMI and the energy retained by the animal (ER), this value is referred as residual HP (RHP) from now. For this analysis, a calculation of the energy partition was made based on the experimental data. The gross energy (GE) ingested was calculated as the product between the GE content of the defoliated pasture and the amount of DM ingested by the animals. The digestible energy (DE) ingested was calculated by subtracting the GE in faeces from the ingested GE. The metabolizable energy (ME) was determined by subtracting from the DE the energy lost as CH<sub>4</sub> and as urine. The energy lost as CH<sub>4</sub> was determined by multiplying the daily emission (g) by its contained energy (0.05495 MJ g<sup>-1</sup>). The energy in urine was calculated from the N excreted in urine, using the equation of Steet *et al.* [10]:  $EU = 0,026 + 0,117 (NU \%)$ ; n = 402, R = 0,92, where: *EU* is the energy lost in urine (Kcal g MW<sup>-1</sup>), *NU* is the N in urine, calculated by subtracting, N faeces and N milk (assuming no retention of N in body reserves) from the N ingested. Energy in milk was calculated according to INRA system [11] for 4 % fat corrected milk, by the following equation:  $EL = 0,75 \times 4,1868 [0,4 MP + 15 \% F / 100 \times MP]$ , where: *EL* is the energy retained in milk (MJ kg<sup>-1</sup>); *MP* is the milk production, *F* is the fat content. Energy retained in body reserves (*Er*) was considered negligible since the experimental period is too short to show changes in body condition. Considering this, the total retained energy (*RE*), calculated as the sum of the energy retained in milk (*EL*) and *Er*, in this case will be equal to the energy retained in milk (*RE = EL*). The predicted HP calculation is: HP predicted = EM ingested – EL. The RHP was calculated as the difference between HP measured and HP predicted.

#### 2.4. Chemical analysis

The dry matter (DM) concentration was determined by drying at 105 °C in an oven for 24 h and ash content was determined by incineration at 600 °C for 4 h for organic matter (OM) calculation. Crude protein (CP) content was determined using the Kjeldahl method in AOAC [12]. Content of neutral detergent fiber (NDFom) was



determined without sodium sulfite and with heat stable amylase. Acid detergent fiber (ADFom) and acid detergent lignin (lignin) were determined using sequential analysis according to Van Soest *et al.* [13]. Gross Energy (GE) was determined using an adiabatic bomb calorimeter. All milk samples were analyzed for fat, protein, and lactose content with infrared spectroscopy. Chromium (Cr) concentration in faecal samples was determined by atomic absorption spectrophotometry, using air and an acetylene flame according to William *et al.* [14]. Cr concentration in the concentrate offered to the cows was also determined in order to verify the amount supplied. The concentrations of CH<sub>4</sub> and SF<sub>6</sub> were determined by gas chromatography.

### 2.5. Statistical analysis

All the animal data were analyzed according to a 2 × 2 Replicated Latin Square design, using PROC MIXED function of SAS [15]. Milk yield and composition were analyzed as repeated measures over time, according to an autoregressive model of order one (AR 1) reported by Littel *et al.* [16]. Pasture data was analyzed according to a 2 × 2 Replicated Latin Square design by ANOVA using the GLM procedure of SAS (2001). In both MIXED and GLM models the interaction treatment x period was initially included, and if it was not significant, it was not included in the final model, following the recommendations of Lorenzen and Anderson [17]. In order to compare the mean treatment values, the test of the minimum significant difference was used.

### 3. Results

#### 3.1. Sward characteristics and defoliation

Herbage mass above 5 cm was higher for HHM (+ 412 kg DM ha<sup>-1</sup>;  $P = 0.0500$ ), as was the pre-grazing herbage height (+ 11 cm;  $P = 0.0374$ ). However, the botanical composition of the pasture, expressed as proportion of grass (89% on average,  $P = 0.1119$ ) and its chemical composition (above 5 cm) did not show significant differences between treatments (Table 1).

**Table 1.** Offered pasture characterization for HHM and LHM swards

	Herbage mass			
	HHM	LHM	SEM	<i>P</i>
Herbage mass above 5 cm (kg DM ha <sup>-1</sup> )	1859	1447	160.1	0.0500
Height (cm) <sup>†</sup>	48	37	3.9	0.0374
Grass/Legume ratio <sup>‡</sup>	86	91	2.5	0.1119
Chemical composition <sup>#</sup> (g kg DM <sup>-1</sup> )				
DM (g kg <sup>-1</sup> )	272	279	10.5	0.6051
OM	909	905	5.2	0.5524
CP	137	142	2.4	0.2635
aNDF <sub>mo</sub>	588	566	9.8	0.2661
ADF <sub>mo</sub>	321	294	3.3	0.2507
GE (MJ kg DM <sup>-1</sup> )	16.7	16.2	0.85	0.6514

<sup>†</sup> measured as extended sheet; <sup>‡</sup> expressed as percentage of grasses; <sup>#</sup> above 5 cm

However, differences were observed in biomass measured above 5 cm between P1 (1410 kg DM ha<sup>-1</sup> on average) and P2 (1897 kg DM ha<sup>-1</sup>) ( $P = 0.0288$ ), associated with the contrasting meteorological conditions in temperature and precipitation between both periods.

Post-grazing herbage height was lower in LHM (- 8 cm;  $P = 0.0015$ ). However, the depth of defoliation was similar between treatments (19 cm on average), representing 44 % and 54 % of the initial height for the HHM and LHM treatment respectively. Herbage utilization did not differ between treatments (38 % on average), as well as the chemical composition of defoliated herbage (Table 2).

**Table 2:** Depth of defoliation, herbage utilization and chemical composition of the herbage disappeared by grazing dairy cows on HHM and LHM treatments

	Herbage mass			
	HHM	LHM	SEM	P
Post-grazing height (cm) <sup>†</sup>	27	19	1.21	0.0015
Depth of defoliation (cm)	21	20	3.05	0.7764
Herbage utilization (%) <sup>#</sup>	30	34	5.64	0.6790
Chemical composition (g kg MS <sup>-1</sup> )				
DM (g kg <sup>-1</sup> )	922	920	1.41	0.5000
OM	903	913	1.56	0.7284
CP	137	147	3.54	0.3488
aNDF <sub>mo</sub>	577	599	3.89	0.1526
ADF <sub>mo</sub>	271	280	0.35	0.0335
GE (MJ kg MS <sup>-1</sup> )	16.6	16.1	0.57	0.6444

<sup>†</sup> measured as extended sheet; <sup>#</sup> above 5 cm

Regarding the comparison between the chemical composition of the offered pasture and the defoliated pasture, no significant differences were found except for the FDA content, which was higher for the pasture offered (+ 32 g kg MS<sup>-1</sup>;  $P = 0.0153$ ).

### 3.2. Herbage Intake

Both faecal output (4.4 kg OM d<sup>-1</sup> on average) and digestibility of the defoliated herbage (740 g kg MO<sup>-1</sup> on average) were similar among treatments. As a consequence, daily OM intake and DM intake did not differ between treatments either (16.7 kg OM and 18.3 kg DM on average) (Table 3).

**Table 3.** Effect of herbage mass on faecal output, herbage OM digestibility and daily intake by grazing dairy cows on HHM and LHM treatments

	Herbage mass		SEM	P
	HHM	LHM		
Faecal output (kg OM d <sup>-1</sup> )	4.6	4.2	0.28	0.3892
Herbage OM digestibility (g kg OM <sup>-1</sup> )	737	743	5.5	0.2811
Herbage OM intake (kg a <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	17.0	16.4	0.63	0.5102
Herbage DM intake (kg a <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	18.6	18.0	0.69	0.5101
Digestible OM intake (kg a <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	12.5	12.2	0.46	0.5836

### 3.3. Grazing behaviour

No differences were found between treatments for grazing time (324 min on average). However, ruminating time was higher for animals in HHM (+ 35 min;  $P = 0.0467$ ), while resting time tended to be longer in LHM (28 min;  $P = 0.0934$ ). The biting rate was higher for the LHM treatment (+ 8 bites min<sup>-1</sup>,  $P = 0.0012$ ) (Table 4).

**Table 4.** Grazing behaviour by dairy cows on HHM and LHM treatments

	Herbage mass			<i>P</i>
	HHM	LHM	<i>SEM</i>	
Grazing time (min)	321	327	13.7	0.6392
Ruminating time (min)	133	98	15.6	0.0467
Resting time (min)	47	75	10.6	0.0934
Biting rate (N° min <sup>-1</sup> )	36	42	9.5	0.0296

### 3.4. Milk production and milk composition

Individual milk yield was similar among treatments (21.1 kg d<sup>-1</sup>, 20.6 kg LCGP d<sup>-1</sup>, on average). However, significant differences were found in milk composition as fat content (+ 1.8 g kg<sup>-1</sup>, *P* = 0.0054) and protein content (+ 0.8 g kg<sup>-1</sup>, *P* = 0.0060) were higher in LHM. (Table 5).

**Table 5.** Milk yield and milk composition by grazing dairy cows on HHM and LHM treatments

	Herbage mass		<i>SEM</i>	<i>P</i>
	HHM	LHM		
Milk yield (kg a <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	21.3	20.9	0.48	0.3475
Fat content (g kg <sup>-1</sup> )	38.6	40.4	0.64	0.0054
Protein content (g kg <sup>-1</sup> )	30.8	31.5	0.79	0.0060
Lactose content (g kg <sup>-1</sup> )	47.7	47.9	0.33	0.5531
Fat yield (g d <sup>-1</sup> )	821	839	21.5	0.3868
Protein yield (g d <sup>-1</sup> )	656	662	15.7	0.6872
Lactose yield (g d <sup>-1</sup> )	1019	1000	23.7	0.4174
Fat and protein corrected milk (kg a <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	20.6	20.7	0.47	0.7527
Body weight variation	-1.93	3.47	1.7	0.0087

### 3.5. Methane emission

Daily methane emission was similar between treatments (363 g d<sup>-1</sup> and 551 L d<sup>-1</sup> on average). No significant differences in average emissions expressed per unit of product (18.3g kg FPCM<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>, on average), per unit of DMI (21 g kg DM<sup>-1</sup> on average) or as a percentage of GE intake ( $Ym = 7.0$  % on average) were found (Table 6).

**Table 6.** Daily methane emission and methane yield by grazing dairy cows on HHM and LHM treatments

	Herbage mass		SEM	<i>P</i>
	LHM	HHM		
Methane emission (g a <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	374	353	34,9	0,6852
Methane emission (L a <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	566	535	73,0	0,6822
Methane emission (g kg FPCM <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	19,1	17,6	2,52	0,5802
Methane yield				
as Gross Energy intake ( <i>Ym</i> )	6,8	7,3	0,59	0,5691
as g methane kg DMI <sup>-1</sup>	20,5	21,5	2,73	0,7115

### 3.6. Energy expenditure

The pulse of oxygen (O<sub>2</sub>P) did not differ between treatments (0.290 mL O<sub>2</sub> beat<sup>-1</sup> MW<sup>-1</sup>, on average) and so the average heart rate (HR) (87.3 beats min<sup>-1</sup>;  $P = 0.2766$ ).

Energy partition was similar between treatments. The average ingested GE was 2725 kJ kg MW<sup>-1</sup> ( $P = 0.4680$ ), the energy contained in the feces was 901 kJ kg MW<sup>-1</sup> on average ( $P = 0.5339$ ), ingested DE was 1830 kJ kg MW<sup>-1</sup> on average ( $P = 0.4693$ ). Energy losses as methane and urine on average were 167 KJ kg MW<sup>-1</sup> ( $P =$

0.5571) and 88 kJ kg MW<sup>-1</sup> ( $P = 0.5486$ ) respectively and the average MEI for both treatments was 1575 kJ kg MW<sup>-1</sup> ( $P = 0.4334$ ). Energy retained in milk was 564 kJ kg MW<sup>-1</sup> on average for both treatments ( $P = 0.5400$ ) and energy retained as body reserves was considered negligible during the experimental period.

HP, did not differ between treatments and the average values were 746 and 1053 kJ kg MW<sup>-1</sup> for measured HP and predicted HP, respectively. The residual HP, calculated as the difference between HP measured and HP predicted, was - 307 kJ kg MW<sup>-1</sup> on average (Table 7).

**Table 7.** Oxygen pulse (O<sub>2</sub>P), heart rate (HR), energy partition and energy expenditure (HP) of cows grazing in pastures with different biomass.

	Herbage mass		SEM	<i>P</i>
	HHM	LHM		
O <sub>2</sub> P (mL O <sub>2</sub> beat <sup>-1</sup> )	0.300	0.280	0.0179	0.3022
HR (beats min <sup>-1</sup> )	86.3	88.3	1.65	0.2766
Energy partition (KJ kg MW <sup>-1</sup> )				
GE ingested	2810	2653	204.3	0.4680
GE faeces	942	860	124.7	0.5339
DE ingested	1868	1793	98.3	0.4693
GE - CH <sub>4</sub>	177	157	32.1	0.5571
GE - urine	86	91	8.5	0.5486
ME ingested	1606	1545	73.1	0.4334
Energy retained in milk	551	577	40.0	0.5400
Heat production (KJ kg MW <sup>-1</sup> )				
Measured HP	762	730	80.9	0.5524
Predicted HP	1100	1007	80.0	0.2825
Residual HP	-338	-277	107.8	0.5868

GE = gross energy; DE = digestible energy; ME = metabolizable energy; HP = heat production; MW = BW<sup>0.75</sup>; HHM= 117.9 kg, LHM = 118.6 kg,  $P = 0.4997$

#### 4. Discussion

Considering that pasture allowance is the main factor affecting pasture intake [18], the effect of biomass was analyzed at the same pasture allowance. This was achieved by increasing the area offered of the pasture, with lower biomass per unit area (LHM treatment). The cows received 30 kg DM day<sup>-1</sup> above the motor scythe cutting height (5 cm), similar values to those used by Dini *et al.* [19], in order not to restrict the individual forage intake by pasture allowance.

Offered herbage mass above 5 cm differed significantly among treatments, being 400 kg DM ha<sup>-1</sup> greater and 11 cm taller on average in HHM treatment. Pasture heights (measured as extended sheet) were within the ranges reported by Dini *et al.* [19], Peyraud *et al.* [20] and Pérez-Prieto *et al.* [21] for similar pastures.

The variations between the treatments were within the expected, although these differences were smaller than projected. This was mainly due to the climatic variations registered during November, throughout the experimental periods.

On average, during November 2015, the rainfall registered for the town of Melo was higher than the average of the last 10 years (+ 26mm; + 30 %), while average temperatures were below the average of the last 10 years (- 2.1 ° C). However, the two experimental periods presented contrasting conditions: in P2 the temperatures were higher than the monthly average (annual and historical), and especially with respect to P1 (in particular, the TMax. reached in P2 was 3.2 ° C greater than P1). In addition, rainfall in P2 was also greater than P1 (+ 21mm) (Table 1). These climatic singularities would explain the accelerated (higher than expected) growth of the pasture towards the second half of the experiment, which could have contributed to reduce the expected differences between treatments.

Regardless of the difference in biomass between treatments, the botanical composition and chemical composition were similar among treatments. These values



of the chemical composition of the pasture in both treatments are in agreement with the those presented by other authors for similar pastures in spring [19, 22, 23]. In particular, since the sward was mainly composed of dactylis (89 % total DM was grass), it is possible to expect good quality of the pasture in spite of the advance of spring as this species blooms relatively late in the season (mid-November onwards) [24]. Considering this, it is worth mentioning that it was possible to differentiate both treatments in quantity of biomass without affecting its quality. Few studies have been found that study the effect of biomass in relation to its availability at the same nutritional value [20], several authors report variations in DMI, milk production and methane yield between treatments, but the pastures also differed in quality [25 - 27].

Regarding the chemical composition of the forage consumed by the cows, it could be expected that its composition would be different from that of the offered forage, since the post-grazing height resulted substantially higher (23 cm on average) than the cutting height of the motor scythe (5 cm on average). Therefore, a requirement to evaluate the quality of the defoliated forage was to estimate the chemical composition of this fraction. In the present study, a subsample composed of strata (strata of 5 cm) located between the upper part of the stems and the average height of the remnant in each treatment was taken as a representative sample of the defoliated forage. This analysis allowed to estimate that defoliated forage was composed mainly of leaves (64 % total DM on average,  $P = 0.9038$ ) and that the chemical composition of this fraction was similar between treatments and it did not differ statistically from the chemical composition of the forage cut above 5 cm except for the FDA content (Table 2). DM digestibility of the defoliated fraction presented relatively high values (74 %), higher than those reported by Dini *et al.* (2012) in spring pastures with dairy cows, but very similar to those presented by González and Astigarraga [22] for dactylis pastures for the same time of the year (November).

The different biomass between treatments (1859 vs. 1447 kg DM ha<sup>-1</sup>,  $P = 0.0500$ ) had no effect on the amount of forage ingested by the cows and averaged

18.3 kg DM d<sup>-1</sup>. This could be explained by the high pasture allowance per cow according to what was reported by Peyraud *et al.* [20], Tharmaraj *et al.* [28], Pérez-Prieto and Delagarde [29], who show that forage intake reaches a maximum when pasture allowance is from 25 to 30 kg DM a<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>, determined at 5 cm or 60 kg MS a<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> at ground level (similar values to those of pasture allowance at ground level expressed in this work). These authors show responses that tend to be asymptotic above these forage allowances, tending to a maximum pasture intake and milk production of approximately 18 kg DM d<sup>-1</sup> and 21 kg d<sup>-1</sup>, respectively. Regarding this, it should be noted that the values of milk production found in this study were 20.6 kg LCGP d<sup>-1</sup> on average for both treatments, coinciding with that reported by Peyraud *et al.* [20] and Pérez-Prieto and Delagarde [29] for pastures and animals of similar characteristics.

Grazing time did not differ between treatments among the 9 hours of observation and it was 324 min on average, which represented 60 % approx. of the total observation time. However, the biting frequency was higher in LHM which could indicate a compensation mechanism for lower bite weight in this treatment. According to the bibliography [30, 31, 32], it is expected that a lower biomass per unit area, negatively affects ingestive behavior. Regarding this, Gibb *et al.* [30] found that, at lower pasture heights, animals increased their grazing time, as well as the number of daily bites, as a compensation strategy to reduce the speed of ingestion, although this could be limited by the requirements of rumination, influenced by the quantity and quality of the pasture consumed. Another interpretation is given by Tharmaraj *et al.* [28]. These authors attribute the difference in the frequency of the bite to the need to chew more with greater bites in pastures with taller forage heights (the average weight of the bite increases with the height of the pasture when increasing the depth of defoliation in each bite), which takes more time per bite. Therefore, the longer time required to chew heavier bites explains the increase in time between successive prehension bites for cows that graze on taller pastures. Based on this interpretation, a time of 1.7 seconds bites<sup>-1</sup> can be estimated in HHM compared to 1.4 seconds bites<sup>-1</sup> in LHM. Observations in terms of the

chewing movements required to accommodate the bolus prior to being swallowed in high pastures were also reported by Astigarraga and Peyraud [33].

Enteric methane emission values did not differ between treatments, being 363 g d<sup>-1</sup> on average, in agreement with those reported by Muñoz *et al.* [26], Waghorn *et al.* [34], Westberg *et al.* [35], and nationally by Dini *et al.* [19], which are in the range of 345-388 g CH<sub>4</sub> d<sup>-1</sup> for dairy cows with similar levels of intake and production. Unitary methane emission also did not differ between treatments, and it was 18.3 g CH<sub>4</sub> d<sup>-1</sup>, similar to that reported by Dini *et al.* [19]. In the present work, it was obtained a production of CH<sub>4</sub> as a proportion of the ingested GE (*Y<sub>m</sub>*) of 7.0 % on average. The values of *Y<sub>m</sub>* obtained are in the range of the values reported in New Zealand by Lassey [36], Boadi and Wittenberg [37] for dairy cows grazing temperate climate forages and within the values reported by the IPCC [38] for the calculation of CH<sub>4</sub> emissions in the National Inventories.

Energy expenditure analysis was made based on the technique developed by Brosh *et al.* [9] (measured HP). This method estimates energy expenditure (HP) through the O<sub>2</sub>P-HR ratio. In dairy cows, HP and heart rate (HR) are affected mainly by the intake of metabolizable energy (ME), the level of production, and the reproductive and physiological states, and not so much by exercise as the activities of dairy cows rarely involve intense physical activity during an important part of the day. In this work, there were difficulties in measuring the volume of O<sub>2</sub> of the animals in P1, however in P2 the measurements of the volume of O<sub>2</sub> in the animals were within the expected values for this type of animals (approximately 300 L beat<sup>-1</sup> kg PV<sup>-0.75</sup>). Based on this, and taking into account the duration of the experiment (20 days in total), HP was estimated by multiplying the HR measured in each period by the O<sub>2</sub>P determined at the beginning of P2. Calculated HP values did not differ between treatments.

Relating the values of HR to the ingestive behaviour (Figure 9), it is observed that the values of HR are minimum at 5:00, and increase after 10:00 and towards

evening, according to the period of greatest activity of ingestion. Similar results are reported by Brosh *et al.* [9], who recorded increases in HR when the intake increased due to an increase in ingested MS.

An estimation of the HP (HP predicted) was also made from the analysis of the partition of the energy ingested by the animals (GE ingested) and the different energy losses (GE faeces, GE urine, GE methane) until reaching the metabolizable energy (ME) and Net Retained Energy (EL) for milk production (assuming the energy retained in tissue is negligible considering the weight variations observed during the experiment). There were no differences between treatments in the predicted HP values ( $1053 \text{ kJ kg MW}^{-1} \text{ d}^{-1}$ , on average), but the residual HP was high ( $-307 \text{ kJ kg MW}^{-1} \text{ d}^{-1}$ , on average).

In order to analyze this difference, it is important to validate the estimation of the ingested ME by the energy partition method. Considering a maintenance energy of  $293 \text{ kJ kg PM}^{-1}$  [41], and assuming that the energy retained in tissue is negligible based on the weight variations observed during the experiment, the retained energy (production + maintenance) was  $857 \text{ kJ kg PM}^{-1}$  on average, which represents 54.4% of the ingested ME estimated by the partition method. However, according to Vermorel and Coulon [42], for this type of diet, it would be expected values of efficiency closer to 60%. Therefore, it is possible that the ingested ME estimated in this work was overestimated by approximately 10% ( $857 \text{ kJ kg PM}^{-1} / 0.60 = 1428 \text{ kJ kg PM}^{-1}$ ). Considering this, the predicted HP could be recalculated, resulting in a value of  $864 \text{ kJ kg PM}^{-1}$ , which is within the range of values reported by Jasisnsky *et al.* [43] for dairy cows.

According to what has been mentioned in previous paragraphs, it is possible that the measured HP is underestimated for animals of these characteristics, which could be associated with a low  $\text{O}_2\text{P}$  value measured in this experiment.

Finally, if there was an effect of the biomass on the feeding behavior (frequency of bites), this did not manifest itself in a different HP due to activities between treatments. According to Thamaraj *et al.* [28], in temperate pastures, with height or non-limiting biomass, as finally resulted for this experiment, the harvest

efficiency in terms of weight per unit of energy consumed in the prehension process is higher in higher swards than in lower swards, but the prehension time per bite increases, which also demands more energy by chewing. In lower swards, with lower biomass, the prehension energy of the bite is lower, associated with less chewing between bites, so that the lower energy expenditure in this process can compensate for the lower bite weight (or less energy harvested by bite). Illius *et al.* [46] report HP per bite of less than 25 J over 5 cm.

Using this value, HP per activity would be approx. 288 to 340 kJ a<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> (HHM and LHM respectively) during the 9 hours behaviour observation period. Therefore, Illius *et al.* [44] conclude that, in temperate pastures, with non-limiting biomass (above 5 cm), the cost of harvest is negligible compared to the energy harvested in each bite in agreement with the results of Di Marco *et al.* [45].

However, in other conditions to those evaluated in this work, such as, for example, differences in the spatial distribution of biomass (heterogeneity) that force a greater search and walk, or differences in the quality of the pasture that imply greater strength of prehension, could demand more challenging grazing behavior strategies to reach a certain intake with consequences in the HP by extra grazing activity.

## **5. Conclusions**

The ranges of pre-grazing biomass evaluated in this work did not affect forage intake, milk production, or unit methane emission from grazing dairy cows, associated with an estimated forage allowance at 5 cm that was close to the forage offer that allows to express the maximum voluntary consumption in grazing for animals of these characteristics.

Although intake was not affected, the cows grazing the treatment with lower biomass (expressed above 5 cm) adapted their behavior by means of a higher

frequency of bites, although this was not accompanied by an increase in the grazing time during the observation time of the animals in this work. The energy cost of prehension bites is very low in temperate pastures with high digestibility, which is why the difference in energy cost, due to the greater number of bites in this treatment, did not result into significant differences in terms of energy expenditure due to extra activity of grazing.

It is possible that, at lower daily pasture allowance, the animals express behaviour adaptations to reach high consumption that are mediated by the biomass and pasture height, with consequences in harvest efficiency and in energy expenditure by extra activity, which could not be evidenced in this work by the pasture allowance used (30 kg MS above 5 cm  $a^{-1} d^{-1}$ ).

### **Acknowledgments**

Financial support was provided by the “Comisión Sectorial de Investigación Científica” (CSIC), of the Universidad de la República (Uruguay). The authors acknowledge technical support received from Cristina Cabrera, Shirley Furtado, Gabriela Arias, Amabelia del Pino y Leticia Martinez for analyses.

### **Conflict of Interest**

The authors declare no conflict of interest.

### **References**

1. Gerber, P. J.; Steinfeld, H.; Henderson, B.; Mottet, A.; Opio, C.; Dijkman, J.; Tempio, G. Tackling climate change through livestock: A global assessment of emissions and mitigation opportunities. Rome, Italy, FAO. **2013**. Available online: [www.fao.org/docrep/018/i3437e/i3437e.pdf](http://www.fao.org/docrep/018/i3437e/i3437e.pdf) (accessed on 15 June 2015).

2. Lizarralde, C.; Picasso, V.; Rotz, C.A.; Cadenazzi, M.; Astigarraga, L. Practices to reduce milk carbon footprint on grazing dairy farms in southern Uruguay: Case studies. *Sust. Agric. Res.* 3 **2014**, 2, 1-15.
3. Astigarraga, L. Modelo de decisión lechero: análisis de alternativas productivas. In: “Intensificación en lechería: la alternativa rentable”. INIA-FUCREA-FAGRO. FPTA 101. Montevideo, Uruguay. **2004**. 24-32. Available online: [http://dedicaciontotal.udelar.edu.uy/adjuntos/produccion/823\\_academicas\\_a\\_cademicaarchivo.pdf](http://dedicaciontotal.udelar.edu.uy/adjuntos/produccion/823_academicas_a_cademicaarchivo.pdf) (accessed 8 October 2017).
4. Di Marco, O.N.; Aello M.S. Energy expenditure due to forage intake and walking of grazing cattle. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* **2001**. 53, 105-110. Available online: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-09352001000100017](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352001000100017). (accessed on 8 June 2015)
5. Comeron, E.; Peyraud, J. Prediction of herbage digestibility ingested by dairy cows. *Rev. Arg. Prod. Anim.* **1993**, 13: 23-30
6. Johnson, K.; Johnson D. Methane emissions from cattle. *J. Anim. Sci.* **1995**. 73, 2483-2492.
7. Gere, J.; Gratton, R. Simple, low-cost flow controllers for time averaged atmospheric sampling and other applications. *Lat. Am. Appl. Res.* **2010**, 40, 377-382.
8. Brosh, A.; Aharoni, Y.; Degen, A.; Wright, D.; Young, B. A. Estimation of energy expenditure from heart rate measurements in cattle maintained under different conditions. *J. Anim. Sci.* **1998**. 76:3054–3064.
9. Nicol, A.M.; Young, B.A. Short-term thermal and metabolic responses of sheep to ruminal cooling: effects of level of cooling and physiological state. *Canadian J. Anim. Sci.* **1990**, 70, 833–843.
10. Street JC, Butcher JE, Harris LE. Estimating urine energy from urine nitrogen. *J. Anim. Sci.* **1964**, 23:1039–1041.
11. INRA (Institut National de la Recherche Agronomique). Ruminant nutrition. Recommended allowances and feed tables. Montrouge, France: Institut

National de la Recherche Agronomique, John Libbey Eurotext. **1989**, 389 p.

12. AOAC. Official Methods of Analysis, 13th ed.; Association of Official Analytical Chemists: Washington, DC, USA, **1990**, 376-384.
13. Van Soest, P.; Roberston, J.; Lewis B. Methods for dietary fiber neutral detergent fiber and non starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* **1991**. *74* (5), 3583 - 3597.
14. William, C.; David, D.; Lismoa O. The determination of chromic oxide in fecal samples by atomic absorption spectrophotometry. *J. Agric. Sci.* **1962**, *59*, 381-385.
15. SAS Institute Inc. 2001. Release 7.00, Cary, NC, USA.
16. Littell, R.; Pendergast, J.; Natarajan R. Modelling covariance structure in the analysis of repeated measures data. *Stat. Med.* **2000**, *19*, 1793-1819.
17. Lorenzen, T.; Anderson V. 1993. Design of Experiments: a No-name Approach. Dekker M. (Ed.). New York, United States. CRC Press. 414 p.
18. Pérez-Prieto, L.A.; Delagarde R. Meta-analysis of the effect of pasture allowance on pasture intake, milk production, and grazing behavior of dairy cows grazing temperate grasslands. *J. Dairy Sci.* **2013**. *96*, 6671–6689
19. Dini, Y.; Gere, J.; Briano, C.; Manetti, M.; Juliarena, P.; Picasso, V.; Astigarraga, L. Methane emission and milk production of dairy cows grazing pastures rich in legumes or rich in grasses in Uruguay. *Anim. 2.* **2012**. *2*, 288-300.
20. Peyraud, J.L.; Comeron, E.A.; Wade, M.; Lemaire, G. The effect of daily herbage allowance, herbage mass and animal factors upon herbage intake by grazing dairy cows. *Ann. Zootech.* **1996**. *45*, 201-217.
21. Pérez-Prieto, L.A.; Peyraud, J.L.; Delagarde R. Does pre-grazing herbage mass really affect herbage intake and milk production of strip-grazing dairy cows? *Grass Forage Sci.* **2013**, *68*, 93-109.
22. González, P.; Astigarraga, L. Productividad de vacas lecheras en pasturas de festuca o de dactilis. *Agrociencia Uruguay* **2010**. *14* (3), 233.



23. Orr, R.J.; Rutter, S.M.; Yarrow, N.H.; Champion, R.A.; Rook, A.J. Changes in ingestive behaviour of yearling dairy heifers due to changes in sward state during grazing down of rotationally stocked ryegrass or white clover pastures. *Appl. Anim. Behav. Sci.* **2004**, *87*, 205–222.
24. García J. Crecimiento y calidad de gramíneas forrajeras en La Estanzuela. Montevideo: INIA. Serie técnica (133)19 p. **2003**.
25. Stakelum, G.; Dillon, P. The effect of herbage mass and allowance on herbage intake, diet composition and ingestive behavior of dairy cows. *Irish J. Agric. Food Res.* **2004**, *43*, 17–30.
26. Wims, C.M.; Deighton, M.H.; Lewis, E.; O’Loughlin, B.; Delaby, L.; Boland, T.M.; O’Donovan, M. Effect of pre grazing herbage mass on methane production, dry matter intake, and milk production of grazing dairy cows during the mid-season period. *J. Dairy Sci.* **2010**, *93* (10), 4976-4985.
27. Muñoz, C.; Letelier, P.A.; Ungerfeld, E.M.; Morales, J.M.; Hube, S.; Pérez-Prieto, L.A. Effects of pregrazing herbage mass in late spring on enteric methane emissions, dry matter intake, and milk production of dairy cows *J. Dairy Sci.* **2016**, *99*, 7945–7955.
28. Tharmaraj, J.; Wales, W. J.; Chapman D. F.; Egan, A. R. Defoliation pattern, foraging behavior and diet selection by lactating dairy cows in response to sward height and herbage allowance of a ryegrass-dominated pasture. *Grass Forage Sci.* **2003**, *58*, 225–238.
29. Pérez-Prieto, L.A.; Delagarde, R. Meta-analysis of the effect of pasture allowance on pasture intake, milk production, and grazing behavior of dairy cows grazing temperate grasslands. *J. Dairy Sci.* **2013**. *96*, 6671–6689.
30. Gibb, M.J.; Huckle, C.A.; Nuthall, R.; Rook, A.J. Effect of sward surface height on intake and grazing behavior by lactating Holstein Friesian cows. *Grass Forage Sci.* **1997**. *52*, 309–321.
31. Forbes T.D.A. Researching the Plant-Animal Interface: The investigation of Ingestive Behavior in Grazing Animals. *J. Anim. Sci.* **1988**, *66*, 2369-2379.

32. Hodgson, J. Variations in the surface characteristics of the sward and the short-term rate of herbage intake by calves and lambs. *Grass Forage Sci.* **1981**, *36*, 49.
33. Astigarraga, L.; Peyraud J.L. Effects of sward structure upon herbage intake by grazing dairy cows. *Ann. Zootech.* **1995**, *44*, 126.
34. Waghorn, G.; Molano, G.; Cavanagh, A. 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. **2003**, 23.
35. Westberg, H.; Lamb, B.; Johnson, K.; Huyler, M. Inventory of methane emissions from U.S. cattle. *J. Geophys. Res.* **2001**, *106*, 12633-12642.
36. Lassey, K.R. Livestock methane emission: From the individual grazing animal through national inventories to the global methane cycle. *Agric. Forest. Meteorol.* **2007**, *142*, 120-132.
37. Boadi, D.A.; Wittenberg, K.M. Methane production from dairy and beef heifers fed forages differing in nutrient density using the sulphur hexafluoride (SF<sub>6</sub>) tracer gas technique. *Can. J. Anim. Sci.* **2002**, *82*, 201-206.
38. IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change). 2006. Guidelines for National Greenhouse Gas Inventories: Agriculture, forestry and other land use. In H. Dong, J. Mangino, T. A. McAllister, J. L. Hatfield, D. E. Johnson, A. Romanovskaya (Working group). Emissions from livestock and manure management. Hayama, Kanawaga, Japan: IGES. Available online: [http://www.ipcc-nggip.iges.or.jp/public/2006gl/pdf/4\\_Volume4/V4\\_10\\_Ch10\\_Livestock.pdf](http://www.ipcc-nggip.iges.or.jp/public/2006gl/pdf/4_Volume4/V4_10_Ch10_Livestock.pdf) (accessed on 8 June 2015).
39. Aharoni, Y.; Brosh, A.; Kafchuk, E. The efficiency of utilization of metabolizable energy for milk production: a comparison of Holstein with F1 Montbeliarde × Holstein cows. *Anim. Sci.* **2006**, *82*: 101-109.
40. Brosh, A.; Aharoni, Y.; Shargal, E.; Sharir, B.; Gutman, M.; Choshniak, I. Energy balance of grazing beef cattle in Mediterranean pasture, the effects of

- stocking rate and season 2. Energy expenditure as estimated from heart rate and oxygen consumption, and energy balance. *Livestock Prod. Sci.* **2004**, 90: 101–115.
41. INRA (Institut National de la Recherche Agronomique) Ruminant Nutrition. Montrouge, France: John Libbey Eurotext. **1989**.
42. Vermorel, M.; Coulon, J.B. Alimentation des vaches laitières: Comparaison des systèmes d'alimentation énergétique. *Inra Prod. Anim.* **1992**, 5 (4): 289 – 298.
43. Jasinsky, A.; Ceriani, M.; Espasandín, A.C.; Mattiauda, D.A.; Carriquiry M. Heat production of primiparous Holstein cows with different feeding strategies during early lactation. In: Proceedings Congreso da Sociedade Brasileira de Zootecnia, Gramado, Brasil. **2016**.
44. Illius, A. W.; Gordon, I. J.; Milne, J. D.; Wright W. Costs and Benefits of Foraging on Grasses Varying in Canopy Structure and Resistance to Defoliation. *Funct. Ecol.* **1995**, 9 (6): 894-903.
45. Di Marco, O.N.; Aello A.S.; Méndez, D.G. Energy expenditure of cattle grazing on pastures of low and high availability. *Anim. Sci.* **1996**, 63: 45-50.