



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrado

**ESTRATEGIAS DE MITIGACIÓN DE LA EMISIÓN DE METANO EN VACUNOS
DE CARNE**

YOANA DINI VILAR

TESIS DE DOCTORADO EN PRODUCCIÓN ANIMAL

URUGUAY

2018



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrado

**ESTRATEGIAS DE MITIGACIÓN DE LA EMISIÓN DE METANO EN VACUNOS
DE CARNE**

YOANA DINI VILAR

**Cecilia Cajarville,
Prof. PhD
Director de Tesis**

**Verónica Ciganda,
Prof. PhD
Co-Director de Tesis**

2018

INTEGRACION DEL TRIBUNAL DE DEFENSA DE TESIS



FACULTAD DE VETERINARIA
Programa de Posgrados

ACTA DE APROBACIÓN DE TESIS

DE DOCTORADO EN PRODUCCIÓN ANIMAL

“ESTRATEGIAS DE MITIGACIÓN EN LA EMISIÓN DE METANO
EN VACUNOS DE CARNE”

Por: Magíster Yoana DINI VILAR
Directora de Tesis: Dra. Cecilia Cajarville
Codirectora de Tesis: Dra. Verónica Ciganda

Tribunal

Presidente: Dr. Pablo Zunino
Segundo Miembro: Dr. Darío Colombatto
Tercer Miembro: Dr. Gilberto Kozloski

Fallo del Tribunal: *Aprobada con Mención*

IPAV, Libertad, San José, 23 de octubre de 2018

El Fallo de aprobación de la Tesis puede ser: Aprobada (corresponde a la nota BBB- en el Acta), o Aprobada con Mención (corresponde a la nota SSS- 12 en el Acta)

Montevideo, 23 de octubre de 2018

La Tesis de Doctorado "Estrategias de mitigación en la emisión de metano en vacunos de carne", defendida por la Mag. Yoana Dini Vilar en el día de la fecha, trata un problema de relevancia para los ámbitos productivos y ambientales de creciente impacto a nivel nacional e internacional.

La información presentada en la Tesis es novedosa y original, refrendada por publicaciones en revistas internacionales, y abre diversas e interesantes perspectivas para líneas de investigación en el futuro.

El documento escrito se consideró correcto aunque se sugirió ampliar algunos aspectos como el contexto del estudio, revisión bibliográfica así como profundizar aspectos de la discusión. En particular se debería ponderar la información con respecto al uso de los marcadores y sus limitaciones. Dichos cambios quedarán incorporados en la versión definitiva de la Tesis.

La exposición oral fue adecuada y realizada en forma clara. La estudiante demostró solidez en sus conocimientos y solvencia para responder las preguntas de los integrantes del Tribunal.

En base a todas estas consideraciones, el Tribunal resuelve otorgar la calificación de "Aprobada con Mención".



Dr. Darío Colomatto



Dr. Gilberto Kozloski



Dr. Pablo Zunino

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar agradezco a mi familia, por ser parte de este largo proceso. A mis padres que han sido un pilar fundamental a lo largo de toda mi vida. A Manuel y a Martina por su amor incondicional, por su apoyo constante, su palabra de aliento y la motivación continua que ayudaron a que todo sea más sencillo.

A Cecilia y a Verónica, les agradezco por confiar en mí, por su tiempo y paciencia, por todo lo que enseñaron pero más que nada por su don de gente, por escucharme y aconsejarme a lo largo de todos estos años. Sin duda dos profesionales de alto nivel académico pero más que nada personas con las que trabajaría una y mil veces por su método, capacidad y constancia.

A José Ignacio Gere por su colaboración constante en el procesamiento de muestras y de datos. Por compartir su conocimiento, su amistad y la disponibilidad continua de colaboración.

Al Dr. Cesar Pinares-Patiño, referente mundial en la temática de este trabajo y quien contestó amablemente a cada una de mis preguntas.

A todo el Grupo de Bovinos y de Nutrición del IPAV en las personas de José Luis Repetto, Analía Pérez, Sebastián Brambillasca, Alejandro Britos, Álvaro Santana y Alejandro Mendoza por su colaboración y disposición ante cualquier inquietud planteada.

A Julieta Mariotta quien me ayudó en los trabajos de campo de los experimentos. A Juan Manuel Clariget por su colaboración en el uso y manejo de Beef NRC. A la Ing. Agr. (PhD) Elly Navajas y a todo el equipo de INIA Las Brujas y de la Central de Prueba de Kiyú por su apoyo y colaboración en el experimento de RFI y durante la faena de los novillos.

Al Laboratorio de Suelos y de Nutrición de INIA La Estanzuela por el procesamiento de las muestras de este trabajo.

A los integrantes del Departamento de Microbiología del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable en la persona de Pablo Zunino y Sofía Fernández por su colaboración e interés en el procesamiento de muestras de contenido ruminal. Del mismo modo a Martín Fraga de INIA La Estanzuela.

A mis compañeros de CONAPROLE por permitirme finalizar mi formación doctoral.

A todos...Gracias!

ÍNDICE

	Página
AGRADECIMIENTOS	i
RESUMEN	1
SUMMARY	3
1. <u>INTRODUCCIÓN</u>	6
2. <u>ANTECEDENTES</u>	7
2.1. PRODUCCIÓN GANADERA EN URUGUAY	7
2.2. GASES DE EFECTO INVERNADERO Y ACUERDOS INTERNACIONALES	8
2.2.1. <u>Principales Gases de Efecto Invernadero (GEIs)</u>	8
2.2.2. <u>Acuerdos internacionales sobre reducción de emisión de GEIs</u>	9
2.3. EMISIÓN DE GASES DE EFECTO INVERNADERO EN URUGUAY	10
2.4. EMISIÓN DE CH ₄ EN RUMIANTES	12
2.4.1. <u>Estrategias de mitigación de la emisión de CH₄</u>	14
2.4.1.1. Manejo de la alimentación	16
2.4.1.2. Consumo residual de alimento	17
2.5. DETERMINACIÓN DE CONSUMO EN PASTOREO	18
3. <u>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</u>	20
4. <u>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</u>	20
4.1. HIPÓTESIS	20
4.2. OBJETIVO GENERAL	20
4.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
5. <u>ESTRATEGIA DE INVESTIGACIÓN</u>	21
6. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	22
6.1. EXPERIMENTO I	23
6.1.1. <u>Diseño experimental, animales, tratamientos y manejo</u>	23
6.1.2. <u>Determinación de la emisión de CH₄</u>	25
6.1.3. <u>Consumo por la Técnica de TiO₂ y análisis químicos</u>	26
6.1.3.1. Cálculo de ganancia o pérdida de peso a partir del consumo	27

6.1.4. <u>Análisis estadísticos</u>	28
6.2. EXPERIMENTO II	28
6.2.1. <u>Diseño experimental, animales, tratamientos y manejo</u>	28
6.2.2. <u>Determinación de la emisión de CH₄</u>	30
6.2.3. <u>Determinación de la cantidad de metanógenas totales</u>	31
6.2.4. <u>Análisis químicos</u>	32
6.2.5. <u>Análisis estadísticos</u>	32
7. <u>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u>	33
7.1. EXPERIMENTO I	33
7.2. EXPERIMENTO II	40
8. <u>CONCLUSIONES</u>	45
9. <u>IMPLICANCIAS</u>	45
10. <u>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	46
11. <u>ANEXOS</u>	55
11.1. ANEXO I – PUBLICACIÓN I	56
11.2. ANEXO II – PUBLICACIÓN II	63
11.3. ANEXO III – PUBLICACIÓN III	70
11.4. ANEXO IV – PERMISO REVISTA VETERINARIA	94

TABLAS Y FIGURAS

TABLAS	Página
Tabla 1. Disponibilidad de forraje, composición química y digestibilidad <i>in vitro</i> de las pasturas utilizadas	24
Tabla 2. Ingredientes y composición de la ración totalmente mezclada (TMR)	29
Tabla 3. Efecto de la calidad de la pastura (tratamiento) y de la estación en el consumo	34
Tabla 4. Efecto de la calidad de la pastura (tratamiento) y de la estación en la emisión de CH ₄	36
Tabla 5. Consumo, ganancia diaria y comportamiento ingestivo en novillos de BCRA y ACRA	41
Tabla 6. Emisión de CH ₄ en novillos de BCRA y ACRA	42

FIGURAS	Página
Figura N° 1. Evolución de las exportaciones de carne bovina según tipo de procesamiento (tt), 2009-2016	8
Figura N° 2. Emisiones Nacionales de CH ₄ por sector	11
Figura N° 3. Emisiones Nacionales de CH ₄ por sector y categoría	11
Figura N° 4. Esquema del protocolo experimental del Experimento I	22
Figura N° 5. Esquema del protocolo experimental del Experimento II	23
Figura N° 6. Número de copias del gen <i>mrcA</i> para novillos BCRA y ACRA	42

RESUMEN

Las emisiones de gases de efecto invernadero (GEI) en el Uruguay se originan mayoritariamente en el sector ganadero y es el metano (CH₄) el gas emitido en mayor proporción. El CH₄ es el producto final del proceso de fermentación entérica de los rumiantes y su emisión está afectada por la cantidad y calidad de los alimentos ingeridos así como por características propias del animal. La mitigación de las emisiones de este gas es necesaria para lograr la intensificación sostenible de los sistemas de producción de carne y al mismo tiempo es parte fundamental de los compromisos de Uruguay ante la UNFCC luego de la firma del Acuerdo de París en 2015. Por este motivo, el objetivo general de esta Tesis es contribuir al proceso de intensificación sostenible de la producción ganadera nacional a través del estudio de posibles estrategias vinculadas con el manejo alimenticio y con características propias del animal (consumo residual de alimento, CRA) para la mitigación de las emisiones de CH₄ entérico. Este objetivo se cumplirá a través de los siguientes dos objetivos específicos: 1. Cuantificar las emisiones de CH₄ entérico en vacunos de carne en condiciones pastoriles y comparar el nivel de emisión de animales consumiendo pasturas de diferente calidad nutricional; y 2. Cuantificar las emisiones de CH₄ entérico en vacunos de carne con niveles de consumo residual de alimento (CRA) altamente contrastantes en condiciones de confinamiento. El cumplimiento de estos objetivos se basó en la realización de dos experimentos. En el **Experimento I** se comparó la emisión de CH₄ entérico entre pasturas de diferente valor nutritivo utilizando la técnica del marcador hexafluoruro de azufre (SF₆). Para el experimento I se emplearon 20 vaquillonas Hereford, agrupadas en dos lotes (n=10) según su peso vivo (PV), en un diseño “crossover” de dos períodos: invierno y primavera. En ambos períodos, cada lote fue asignado a dos pasturas de calidad inicial contrastante: alta calidad vs. baja calidad (65,5% vs. 71,2% de digestibilidad de materia seca (DMS); 54,9% vs. 40,9% de fibra detergente neutro (FDN), y 11,6% vs 22,8 % de proteína cruda (PC)). Cada período experimental consistió de 8 días de adaptación a la dieta y 5 días de medición. El **Experimento II** consistió en la medición de la emisión de CH₄ entérico, utilizando la técnica del SF₆, en novillos Hereford con valores contrastantes de consumo residual de alimento (CRA) en condiciones de confinamiento. Se evaluaron 18 novillos que fueron agrupados en dos lotes (n=9) en función de su CRA, siendo los tratamientos evaluados: BCRA (alta eficiencia) y ACRA (baja eficiencia) (-0,85 kg ± 0,17 Materia Seca Ingerida/d vs. 0,94 ± 0,23 MSI/d, respectivamente). Se utilizó un diseño de medidas repetidas en el tiempo. El periodo experimental fue de 20 días, siendo los primeros 8 días de adaptación de los animales al manejo e implementos para la técnica de determinación de CH₄. Se realizaron dos periodos consecutivos de 5 días cada uno de medición de la emisión de CH₄, con un intervalo de 2 días entre ellos. Todos los resultados fueron analizados mediante el procedimiento mixto de SAS.

En el **Experimento I**, los animales que pastorearon en la pastura de alta calidad emitieron 14% menos CH₄ expresado como % de la Energía Bruta Ingerida (Y_m) y 11% menos CH₄ expresado por unidad de MSI, en relación a los animales que pastorearon en la pastura de baja calidad. En el **Experimento II**, los animales más eficientes (BCRA) emitieron 27% menos CH₄ expresado tanto como % de la Energía Bruta Ingerida (Y_m) como por unidad de MSI que los menos eficientes (ACRA).

Los resultados obtenidos permiten enfatizar que el manejo de la calidad de la pastura y la inclusión de animales más eficientes (BCRA) en nuestros rodeos permitiría reducir las emisiones de CH₄ de los rumiantes y por ende las emisiones reportadas en los inventarios nacionales de GEI.

Palabras clave: CH₄, vacunos de carne, pastoreo, confinamiento, consumo, dióxido de Titanio, consumo residual de alimento, SF₆.

SUMMARY

In Uruguay, Greenhouse gas (GHG) emissions mostly come from the livestock production sector within which the methane (CH₄) gas shows the highest values of emissions. CH₄ is the final product of the enteric fermentation process that occurs in ruminants and its emission is affected by the quantity and quality of the food intake as well as by animal's own characteristics. The mitigation of CH₄ emissions is necessary to achieve a sustainable intensification of the meat production systems, and at the same time, to achieve Uruguay's commitments signed at the Paris Agreement in 2015. For this reason, the general objective of this Thesis is to contribute to the process of sustainable intensification of the national livestock production sector, through the study of alternatives related with feed management strategies and with animal characteristics (residual feed intake, RFI) for the mitigation of enteric CH₄ emissions. This objective was achieved through the following two specific objectives: 1. To quantify the effect of pasture quality on enteric CH₄ emissions in beef cattle under grazing conditions; and 2. To quantify the effect of highly contrasting levels of RFI on enteric CH₄ emissions in beef cattle under confinement conditions. These objectives were based on two experiments. In **Experiment I**, enteric CH₄ emissions from two pastures with different nutritive quality were compared using the sulfur hexafluoride (SF₆) tracer technique. Experiment I used 20 Hereford heifers, grouped in two lots (n = 10) according to their live weight (LW), in a "crossover" design of two periods: winter and spring. In both periods, each batch was assigned to two pastures of initial quality contrast: high quality vs. low quality (65.5% vs. 71.2% dry matter digestibility (DMD), 54.9% vs. 40.9% neutral detergent fiber (NDF), and 11.6% vs. 22.8% of crude protein (CP)). Each experimental period consisted of 8 days of adaptation to the diet and 5 days of measurements. **Experiment II** consisted in the measurement of the enteric CH₄ emission, again using the SF₆ technique, in 18 Hereford steers with contrasting values of RFI, under confinement conditions. The steers were grouped in two lots (n = 9) according to their RFI, with the treatments evaluated being LRFI (high efficient animals) and HRFI (low efficient animals) (-0.85 kg ± 0, 17 Dry Matter Intake/d vs. 0.94 ± 0.23 DMI/d, respectively). A repeated measurements experimental design was used. The experimental period consisted of 20 days, being the first 8 days dedicated to the adaptation of the animals to the management and implements for the technique of determination of CH₄. Two consecutive periods of 5 days each were carried out for the CH₄ emission measurement, with an interval of 2 days between them. All results were analyzed using the mixed procedure of SAS.

In **Experiment I**, the animals that grazed in the high quality pasture emitted 14% less CH₄ expressed as % of the Gross Energy Intake (Y_m) and 11% less CH₄ expressed per unit of DMI, with respect to the animals that grazed the low quality pasture. In **Experiment II**, highest efficient animals (LRFI) emitted 27% less CH₄ expressed both as % of the Gross Energy Intake (Y_m) and per unit of DMI, than the least efficient (HRFI).

The obtained results allow emphasizing that managing the quality of the pasture and including in our rodeos more efficient animals (LRFI) it is possible to reduce CH₄ emissions of ruminants and therefore to report lower emissions in the national GHG inventories.

Keywords: CH₄, beef cattle, grazing, confinement, intake, Titanium dioxide, residual feed intake, SF₆.

Esta Tesis está basada en dos Experimentos referidos en el texto por números romanos (Experimentos I y II), que dieron lugar a tres publicaciones:

Exp. I. Dini, Y.; Ciganda, V.; Cajarville, C. Estudio de la variabilidad de la técnica de estimación de consumo en pastoreo a través del marcador externo Dióxido de Titanio. *Veterinaria (Montevideo)*, v., 54 (208), p.: 4-9, 2017 (ANEXO I).

Exp. I. Dini, Y.; Gere, J.I.; Cajarville, C.; Ciganda, V. Dini, Y., Gere, J.I., Cajarville, C., Ciganda, V.S. Using highly nutritious pastures to mitigate enteric methane emissions from cattle grazing systems in South America. 2017. *Animal Production Science*, . Article in Press. <https://doi.org/10.1071/AN16803> (ANEXO II).

Exp. II. Dini, Y.; Cajarville, C; Gere, J.I.; Fraga, M.; Fernández, S.; Pravia, M.I.; Navajas, E.; Ciganda, V.S. Association between residual feed intake (RFI) and enteric methane emissions in Hereford steers. *Traslational Animal Science*, txy111, <https://doi.org/10.1093/tas/txy111> (ANEXO III).

En la Publicación I, los derechos de autor fueron transferidos a la Revista Veterinaria (SMVU- Uruguay), la que otorgó el permiso correspondiente para su inclusión en la presente Tesis (ANEXO IV). En la Publicación II, *Animal Production Science* los autores conservan los derechos de autor del trabajo, cediendo a la revista una Licencia de Publicación.

1. INTRODUCCIÓN

El cambio climático y el consecuente calentamiento global, es un fenómeno provocado por el incremento de gases de efecto invernadero (GEIs) en la atmósfera, los que provienen fundamentalmente de la actividad del hombre. Dicho fenómeno se ha convertido en una de las preocupaciones mundiales más importantes de la actualidad. A partir de la firma del "Acuerdo climático de París", formalizado en diciembre de 2015 por 195 países (entre ellos Uruguay), se estableció la presentación periódica de cada país de sus compromisos de reducción de emisiones y sus planes de adaptación al cambio climático (Carlino, 2016). En este sentido, Uruguay elabora sus inventarios mayoritariamente a partir de información reportada por el Panel Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático (IPCC, por su sigla en inglés) para similares condiciones productivas. A diferencia de lo que ocurre en países industrializados, las principales emisiones de GEIs del país son, en orden de importancia, las del gas metano (CH_4) y las del óxido nitroso (N_2O), provenientes mayoritariamente del sector ganadero (MVOTMA, 2016). En función de ello, hace algún tiempo se viene investigando a nivel nacional en la cuantificación de ambos GEIs en diferentes condiciones productivas (Perdomo et al., 2009; Berger, 2011; Dini et al., 2012; Dini et al., 2017) y en el cálculo de sus factores de emisión. El CH_4 es un producto final de la fermentación entérica de rumiantes, y aproximadamente entre el 2-12% de la energía bruta ingerida por los rumiantes se pierde como CH_4 (Vlaming, 2008). Si bien se pueden tomar medidas para reducir dichas ineficiencias, la formación de CH_4 es fundamental para el adecuado funcionamiento ruminal (Clark et al., 2011).

Uruguay es un país históricamente ganadero, con una producción predominantemente pastoril extensiva sobre pasturas naturales de baja calidad nutricional. Desde hace algunos años, sin embargo, los patrones productivos han ido cambiando, incrementándose la producción pastoril intensiva principalmente a través de la incorporación de pasturas implantadas de alta calidad nutricional. Además, se ha registrado un aumento en el número de establecimientos de engorde a corral basados en sistemas de producción que incorporan altas proporciones de grano en las dietas animales (MGAP-OPYPA, 2017). En nuestro país, a pesar de la importancia del sector ganadero en la economía, no existe hasta el momento información referida a la emisión de CH_4 entérico en vacunos de carne bajo diferentes condiciones de producción. Es por ello que el objetivo de esta Tesis es evaluar el efecto de diferentes estrategias vinculadas con el sistema de producción, y por ende con el manejo alimenticio y las características propias del animal (ej. consumo residual de alimento, CRA), sobre las emisiones de CH_4 entérico en vacunos de carne.

Este trabajo se fundamenta por un lado en que las características de la dieta aportada a los animales inciden sobre la emisión de CH_4 entérico. En este sentido es sabido que la cantidad, calidad y el tipo de alimento ingerido por rumiantes afecta los procesos de fermentación entérica y por ende, la emisión de CH_4 (McCaughy et al., 1999; Clark et al.,

2001; Lee et al., 2004; Hammond et al., 2011). En condiciones predominantemente pastoriles como sucede en nuestro país, la importancia radica principalmente en la evaluación sobre las mejoras en la calidad de las pasturas que componen la dieta animal y su efecto sobre la metanogénesis, sin afectar la productividad animal. Asimismo, dada la importancia que presenta para el país la producción ganadera pastoril y las dificultades que históricamente se han reportado para la determinación del consumo en dichas condiciones es que se plantea la posibilidad de evaluar el uso de la técnica que utiliza dióxido de titanio (TiO_2) (Short et al., 1996; Titgemeyer et al., 2001) como marcador externo. Si bien existen numerosas técnicas que permiten la estimación de la materia seca ingerida (MSI) por animales bajo condiciones de pastoreo, el comportamiento selectivo del animal incorpora una importante fuente de variabilidad que afecta la confiabilidad de los resultados obtenidos, como ha sucedido con la medición directa de la ingesta de forraje (oferta-rechazo) (Beretta et al., 2013) o con el uso de alcanos. La técnica que utiliza dióxido de titanio (TiO_2) ha sido reportada como una alternativa confiable en la estimación del consumo en rumiantes en pastoreo (Glindemann et al., 2009; Müller et al., 2012; Sampaio et al., 2011) y se plantea como una alternativa viable al uso del cromo (Cr_2O_3) ya que se trata de un aditivo de la dieta animal totalmente inocuo sobre la salud humana. Para ambas técnicas sin embargo, se han reportado algunas limitaciones, principalmente referidas a su recuperación fecal (Titgemeyer et al., 2001; De Souza et al., 2015), pero que no invalidan su uso a nivel pastoril.

Por otro lado, varios estudios han encontrado que las emisiones de CH_4 entérico también son afectadas por la genética animal y han reportado que animales seleccionados por su bajo consumo residual de alimento (CRA) registran menores emisiones de CH_4 (Basarab et al., 2013). En el país existió durante el desarrollo de esta Tesis un Proyecto ANII - RTS_1_2012_1_3489 en la Central de Prueba de Kiyú (San José, Uruguay) que permitió estudiar el efecto de esta variable sobre la emisión de CH_4 entérico.

2. ANTECEDENTES

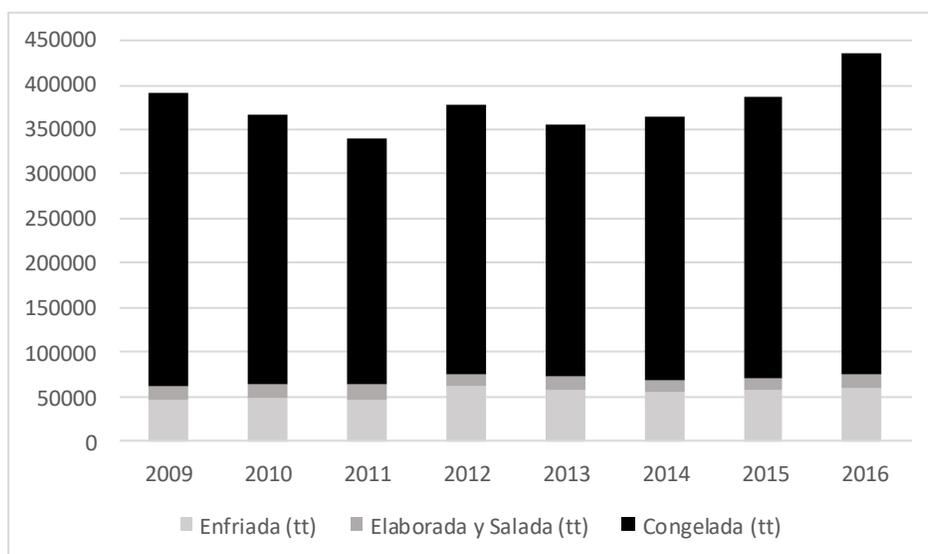
2.1. PRODUCCION GANADERA EN URUGUAY

Uruguay es un país principalmente ganadero ocupando actualmente dicho sector 12.393.000 has, lo que representa el 70% del total de la superficie nacional. El stock de ganado de carne es de 12.4 millones de cabezas y representa el 21% de las exportaciones de origen agropecuario del país (MGAP-DIEA, 2017). Dichas exportaciones son, en orden de importancia, productos congelados, elaborados y salados y productos enfriados (Fig.1).

Durante el último año, China siguió afirmándose como el destino más importante de las carnes uruguayas (MGAP-OPYPA, 2017).

La producción ganadera en Uruguay ha sido tradicionalmente realizada en condiciones extensivas, a partir del pastoreo directo de pasturas de baja calidad nutricional y sin suplementación. Desde el año 2003 se ha registrado un incremento constante del precio del novillo gordo (MGAP-DIEA, 2017) que en cierta medida parece haber incidido en la transformación de los sistemas ganaderos nacionales. En los últimos años se ha incrementado el área de mejoramientos sobre campo natural e incluso de pasturas y verdeos, permitiendo así una intensificación de los sistemas ganaderos. Dicha intensificación también se ha basado en la suplementación con granos de cereales y subproductos agroindustriales, principalmente en la etapa de terminación de ganado en confinamiento. En este sentido se ha dado crecimiento constante del stock de animales encerrados (MGAP-OPYPA, 2017) para terminación.

Figura N° 1. Evolución de las exportaciones de carne bovina según tipo de procesamiento (tt), 2009-2016



Fuente: MGAP-DIEA (2017)

2.2. GASES DE EFECTO INVERNADERO Y ACUERDOS INTERNACIONALES

2.2.1. Principales Gases de Efecto Invernadero (GEIs)

El vapor de agua (H₂O), dióxido de carbono (CO₂), óxido nitroso (N₂O), metano (CH₄), y ozono (O₃) son los principales gases de efecto invernadero en la atmósfera terrestre. Estos

interaccionan con la radiación infrarroja emitida por la superficie de la Tierra, la atmósfera, y las nubes, atenuando las variaciones de temperatura que existirían si no estuvieran presentes (MVOTMA, 2016). Desde la revolución industrial, y debido principalmente al uso intensivo de los combustibles fósiles en las actividades industriales y el transporte, se han producido sensibles incrementos en las cantidades de estos GEIs emitidos a la atmósfera. Esto se ha visto agravado ya que otras actividades humanas, como la deforestación, han limitado la capacidad regenerativa de la atmósfera para secuestrar el CO₂, principal responsable del efecto invernadero. Se prevé que los futuros cambios en el clima incluyan más calentamiento, cambios en las pautas y cantidades de las precipitaciones, subida del nivel del mar y cambios en la frecuencia e intensidad de algunos sucesos extremos (IPCC, 2001).

Con la finalidad de evaluar la contribución relativa de cada gas al calentamiento global, se utiliza el índice llamado Potencial de Calentamiento Atmosférico (PCA) que resulta de relacionar el efecto particular de dicha masa liberada, con el de una masa equivalente de CO₂ (tomado como referencia) emitido a la atmósfera. El CH₄ presenta un PCA de 21, es decir que cada tonelada de CH₄ emitida se considera con un potencial de calentamiento a 100 años equivalente a 21 toneladas de CO₂. El N₂O tiene un PCA de 310, es decir que cada tonelada emitida se considera que tiene un potencial de calentamiento a 100 años, equivalente a 310 toneladas de CO₂ (MVOTMA, 2016).

2.2.2. Acuerdos internacionales sobre reducción de emisión de GEIs

El Protocolo de Kioto (1997) establece que los países que figuran en el Anexo B acordaron reducir sus emisiones antropógenas de gases de efecto invernadero (CO₂, CH₄, N₂O, HFC, PFC y SF₆) a un nivel inferior en no menos de 5% en comparación con las emisiones de 1990 (IPCC, 2001). Dicho Protocolo consta de dos períodos de actuación: 2008-2012 y 2013-2020. Los países en vías de desarrollo, dentro de los que se encuentra Uruguay, no están incluidos en dicho Anexo pero se han comprometido a elaborar sus inventarios periódicamente.

En el Acuerdo climático de París (2015) los países se han comprometido a presentar periódicamente sus compromisos de reducción de emisiones y sus planes de adaptación al cambio climático con el objetivo de mantener el aumento de la temperatura por debajo de 2°C con respecto a los niveles pre-industriales, y también proseguir los esfuerzos para limitar ese aumento de la temperatura a 1,5°C, nivel considerado vital para salvaguardar a los países más vulnerables (Carlino, 2016). Su aplicabilidad será para el año 2020, cuando finaliza la vigencia del Protocolo de Kioto.

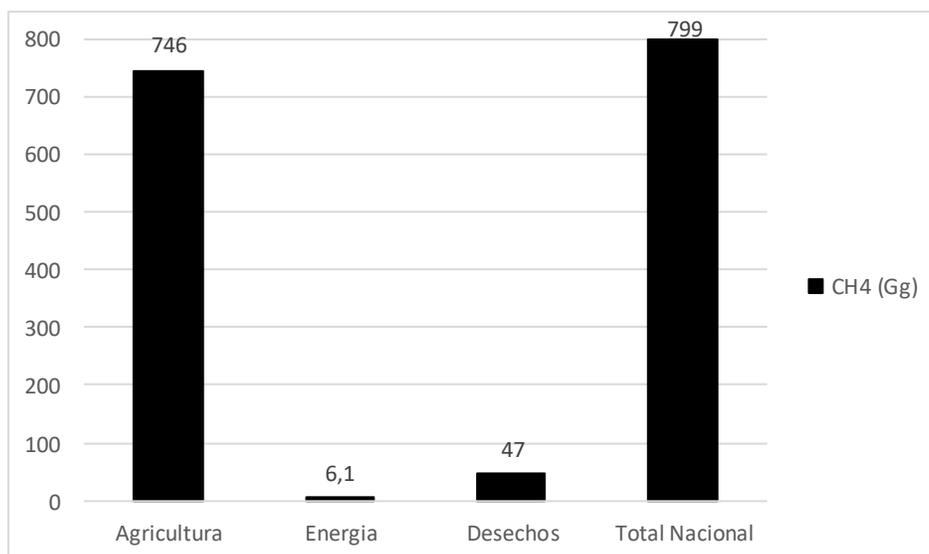
A partir de los acuerdos vigentes anteriormente descritos es que Uruguay elabora sus inventarios nacionales de GEIs desde 1995. El organismo encargado de la elaboración de dichos inventarios es el Ministerio de Vivienda, Ordenamiento Territorial y Medio Ambiente (MVOTMA) y utiliza para ello las directrices del IPCC.

2.3. EMISION DE GASES DE EFECTO INVERNADERO EN URUGUAY

A diferencia del perfil mundial de emisiones, en el cual el CO₂ representa más del 70% de las emisiones totales, en Uruguay las emisiones de CH₄ totalizaron 799 Gg en el año 2012, representando el 43% de las emisiones totales nacionales. El sector Agricultura, aportó el 93,3% del total del CH₄ emitido a nivel nacional, seguido por el sector Desechos el cual aportó el 5,9% y por último el sector Energía con tan solo 0,8% del total de emisiones de CH₄ (Fig. 2 y 3). El 87% del total de las emisiones de CH₄ en nuestro país provienen de la fermentación entérica (MVOTMA, 2016).

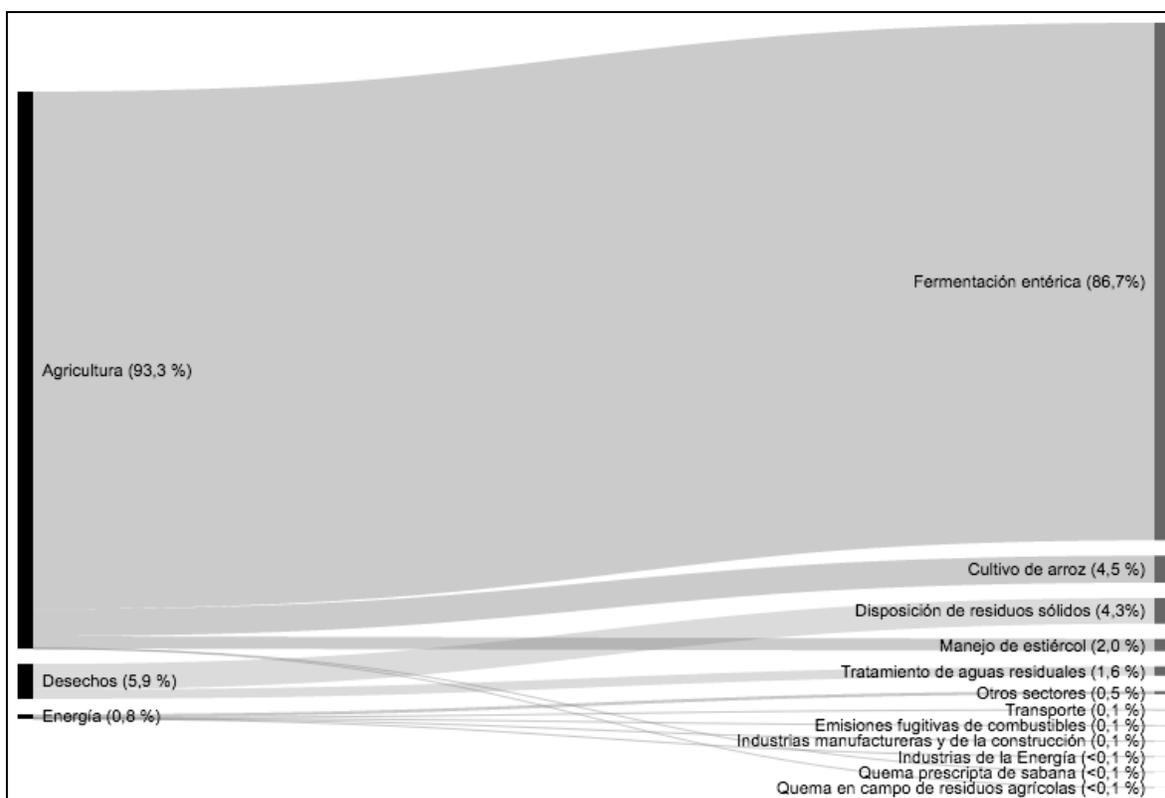
Dada la participación y relevancia del sector ganadero en la economía nacional y en las emisiones totales del país reportadas en los inventarios nacionales, surge la necesidad de investigar sobre la emisión de CH₄ entérico en los diferentes sistemas productivos del país. A nivel mundial, los sistemas de producción pastoriles han sido cuestionados por emitir más CH₄ entérico por unidad de producto que los sistemas mixtos o aquellos basados en el alto uso de concentrados. En este sentido, para países agroexportadores como Uruguay, donde los sistemas de producción ganaderos son mayoritariamente de base pastoril, se debe afrontar el desafío de incrementar la productividad animal para satisfacer la demanda creciente de alimentos y al mismo tiempo reducir las emisiones de CH₄ por unidad de producto animal (ej. kg CH₄/kg carne) (Makkar y Vercoe, 2007).

Figura N° 2. Emisiones Nacionales de CH₄ por sector



Fuente: MVOTMA, 2016

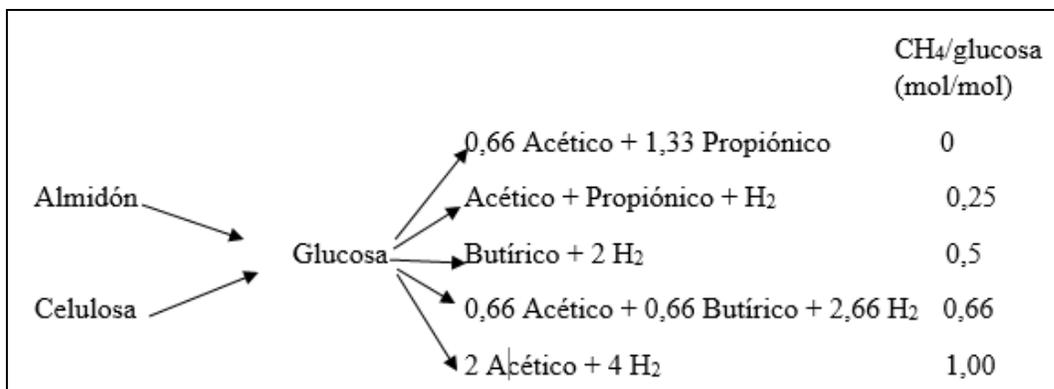
Figura N° 3. Emisiones Nacionales de CH₄ por sector y categoría



Fuente: MVOTMA, 2016

2.4. EMISION DE CH₄ EN RUMIANTES

El alimento ingerido por los rumiantes no está directamente disponible para ser utilizado por el animal. A través de la masticación, el alimento sufre primero una acción mecánica que permite reducir el tamaño de la partícula pero que no es suficiente para permitir la absorción de los nutrientes. En el rumen, los alimentos y líquidos ingeridos se mezclan y se mantienen en condiciones anaeróbicas, normalmente a un pH de 5,6-6,7 y 39°C (Janssen, 2010). Aquí el alimento sufre una transformación adicional por acción de la rumia y por la acción de la microbiota ruminal (Church, 1990). En los últimos años mucho se ha estudiado sobre la diversidad microbiana ruminal. Según Kamra et al. (2005) la misma está compuesta por diferentes tipos de microorganismos. Dentro de ellos, los más abundantes son las bacterias, con 10^{10} - 10^{11} células/ml, mayoritariamente Gram-negativas, que están representadas por más de 50 géneros conocidos, siendo menores las cantidades de protozoarios ciliados y hongos. Dentro de los procariotas se encuentran los microorganismos productores de CH₄, las Arqueas metanogénicas. Dentro de estas últimas, Kamra (2005) menciona siete especies diferentes que representan cinco géneros de metanógenas: *Methanobacterium formicicum*, *Methanobacterium bryanti*, *Methanobrevibacter ruminantium*, *Methanobrevibacter smithii*, *Methanomicrobium mobile*, *Methanosarcina barkeri* y *Methanoculleus olentangyi*, que se encuentran a altas concentraciones relativas (10^7 - 10^9 según el mismo autor). Esta comunidad microbiana participa, utilizando diferentes mecanismos, en la fermentación de parte de los componentes del alimento ingerido (Blas et al., 2008). Poseen enzimas capaces de actuar sobre los carbohidratos de reserva (almidón) así como también sobre los carbohidratos estructurales (celulosa, hemicelulosa y pectinas) que componen las paredes celulares y fermentan luego los azúcares liberados dando lugar a la formación de ácidos grasos volátiles (AGV) (acético, butírico y propiónico), CO₂, CH₄ y calor (McDonald et al., 1995), así como al crecimiento y proliferación de los propios microorganismos (Blas et al., 2008). El acético, butírico y propiónico forman una parte importante de los requerimientos de energía y carbono de los rumiantes, y se absorben en gran parte a través de la pared del rumen (Janssen, 2010). La relación de AGV producidos, es un aspecto a considerar ya que regula la producción de hidrogeniones (H₂) y por ende la producción de CH₄ (Johnson y Johnson, 1995) a nivel ruminal. Las posibles vías de la fermentación de la glucosa dan como resultado que se formen diferentes cantidades de H₂, por lo que la estequiometría de la formación de CH₄ a partir de la glucosa varía, de acuerdo a las siguientes ecuaciones (Janssen, 2010):



De esta forma, la cantidad de CH₄ formada por unidad de alimento digerido depende de la ocurrencia de las distintas vías de fermentación, las cuales producen diferentes cantidades de H₂. Al mismo tiempo, la ocurrencia preferencial de una u otra vía depende de las actividades relativas de las especies microbianas que actúan en cada una de ellas. Asimismo, la selección de cada vía está controlada termodinámicamente por la concentración de H₂ predominante en el rumen (Janssen, 2010). En la formación de acético y butírico se liberan H₂ que promueven la producción de CH₄, mientras que la formación de propiónico implica captura de H₂, por lo que puede ser considerada como una forma competitiva en el uso del H₂ (Vlaming, 2008).

El CH₄, uno de los productos finales de la fermentación ruminal, es formado por Arqueas metanogénicas (Martin et al., 2010), quienes utilizan el H₂ producido por eubacterias fermentativas, protozoarios y hongos para reducir el CO₂ a CH₄ ($4\text{H}_2 + \text{CO}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$). Por lo tanto, la metanogénesis es principalmente un sumidero de H₂ metabólico en el rumen (Yáñez-Ruiz et al., 2010).

El CH₄ no puede ser utilizado por el animal y es eliminado en mayor proporción por eructación junto con otros gases producidos en el rumen. La formación de CH₄ representa para el animal una pérdida de entre el 2 al 12% de la energía bruta ingerida (EBI) en los alimentos, resultando en una fuente de emisión de GEIs hacia la atmósfera (Vlaming, 2008). Sin embargo, la metanogénesis y la eliminación de los gases son un componente esencial en el rumen ya que permiten mantener el pH ruminal en condiciones estables para la actividad microbiana (Martin et al., 2010). En este sentido, las Arqueas metanogénicas, anaerobias estrictas, son muy sensibles a cambios en el medio ruminal, especialmente pH, siendo su rango óptimo de 6,5 a 7,0 (Blas et al., 2008). Por ello, cualquier intento de modificar la metanogénesis debe tener en cuenta la forma alternativa de remoción del H₂, de manera que no se vea perjudicada la eficiencia del sistema digestivo (Clark et al., 2011).

2.4.1. Estrategias de mitigación de la emisión de CH₄

Diversas son las estrategias que se han planteado a lo largo de los años para mitigar las emisiones de CH₄ entérico. Entre ellas se puede mencionar:

1) Incorporación en la dieta de inhibidores de la metanogénesis. Los compuestos utilizados para disminuir la producción de CH₄ en el rumen pueden ser divididos de acuerdo a su mecanismo de acción: a) aquellos que direccionan las moléculas de H₂ hacia productos diferentes al CH₄ (ej. ionóforos y taninos) y, b) aquellos que inhiben directamente el crecimiento o metabolismo de los metanógenos (ej. aceites esenciales). Los ácidos grasos de cadena media y larga ejercen su acción a través de ambos mecanismos (Ramírez et al., 2014).

Los ionóforos son antibióticos muy eficaces contra bacterias Gram⁺, y presentan poca o ninguna actividad contra Gram⁻ (Ramírez et al., 2014). Las Gram⁻ compiten con las Arqueas metanogénicas por H₂ disponibles en el rumen y de este modo se da mayor producción de ácido propiónico y succínico y menor producción de CH₄ entérico. Asimismo los ionóforos son poliésteres altamente lipofílicos que se acumulan en las membranas celulares (Russell y Houlihan, 2003) y catalizan el movimiento rápido de cationes como el sodio, potasio y calcio a través de las membranas celulares (Clark et al., 2001). Cuando se incorpora a la dieta afectan la producción de CH₄ de dos maneras: 1) aumentan la eficiencia de conversión de alimento y esto reduce la producción de CH₄ por unidad de producto; 2) debido a su efecto sobre la fermentación ruminal, reducen directamente la cantidad de CH₄ producido por unidad de ingesta de alimento. Se ha reportado que la magnitud y la persistencia de la reducción de la metanogénesis es variable (Odongo et al., 2007) y que no persiste en el tiempo por capacidad de la microbiota ruminal para adaptarse al ionóforo (Johnson y Johnson, 1995). Su prohibición en la Unión Europea ha desestimulado su uso como estrategia de mitigación a nivel mundial (Gerber et al., 2013).

Los taninos son metabolitos secundarios de las plantas y se clasifican como compuestos polifenólicos de alto peso molecular. Dos modos de acción de los taninos en la metanogénesis han sido propuestos: un efecto directo sobre las metanógenas ruminales y un efecto indirecto sobre la producción de hidrógeno debido a la menor degradación del alimento (Martín et al., 2010). Al igual que los ionóforos, los taninos poseen actividad antibacteriana más marcada contra las bacterias Gram⁺ que contra las Gram⁻. Los grupos fenólicos de los taninos se pueden enlazar con proteínas y fosfolípidos de la membrana externa de la pared celular, lo cual explica porque las bacterias Gram⁻, a diferencia de las Gram⁺, son relativamente más resistentes a la acción de estos compuestos (Ortiz et al., 2014). El efecto de los taninos sobre la metanogénesis es variable, reportándose hasta un 20% de reducción de la emisión pero también se reporta que la ingesta y la producción

animal pueden verse comprometidas (Hristov et al., 2013). En este sentido, se reporta que una dosis de 2% de Taninos Condensados de quebracho (*Schinopsis balansae*) inhibe el crecimiento microbiano y una dosis superior al 3% es letal para los microorganismos ruminales (Ortiz et al., 2014).

Los aceites esenciales son compuestos aromáticos, volátiles, de aspecto oleoso, responsables del olor y sabor característico de las plantas. Al ser suministrados a rumiantes pueden, a nivel ruminal, interactuar con las membranas celulares, reducir la captación de glucosa e inhibir el crecimiento de algunas bacterias Gram⁺ y Gram⁻. Sin embargo, estas últimas presentan mayor tolerancia debido a su membrana externa, que constituye una superficie hidrófila que actúa como barrera impermeable (Ortiz et al., 2014). Según Ramírez et al. (2014) los aceites esenciales poseen propiedades antimicrobianas, evidenciándose una disminución de la producción de acético y un incremento de la producción de propiónico. Aunque según este autor la información no es consistente, los aceites esenciales podrían además reducir la producción de CH₄ debido a la inhibición selectiva del crecimiento de protozoarios, que conviven en estrecha sintropía con las Arqueas metanogénicas (lo mismo sucede con el uso de ionóforos). Los protozoarios benefician a las Arqueas metanogénicas de diferentes formas. Las Arqueas metanogénicas han sido observadas sobre la superficie exterior de los protozoarios ciliados del rumen y como endosimbiontes de éstos. La eliminación de H₂ permite que el protozoario fermente la materia orgánica hasta acetato y CO₂, evitando la generación de productos reducidos como etanol y lactato, obteniendo una máxima producción de ATP. Asimismo, los protozoarios atenúan el efecto del oxígeno a través de sus hidrogenosomas oxígeno-tolerantes y proveen un medio para la retención ruminal de las metanógenas. Teniendo en cuenta que alrededor del 25% de las metanógenas ruminales viven en asociación con protozoarios, se espera que una reducción en los últimos disminuya los primeros (Ortiz et al., 2014).

Los ácidos grasos de cadena media y larga inhiben el crecimiento de bacterias Gram⁺ y Arqueas metanogénicas vía absorción y ruptura de las membranas celulares (Ramírez et al., 2014). Ungerfeld et al. (2005) encontraron que el ácido hexadecatrienoico, de cadena larga, inhibió la producción *in vitro* de CH₄ en un 97%. Además, la biohidrogenación de ácidos grasos insaturados puede constituirse en una ruta alternativa para la utilización de H₂ en el rumen. La inclusión de lípidos ha sido reportada como una posible alternativa (Hristov et al., 2013) siempre que su inclusión no sobrepase el 8% de la ingesta (Grainger y Beauchemin, 2011) ya que de esta forma se evitarán efectos sobre la salud ruminal y sobre la productividad animal.

2) la mejora de la calidad del alimento proporcionada a los rumiantes tiene efectos reductores de la metanogénesis dado que la fermentación ruminal produce mayores niveles

de ácido propiónico, el cual compite por los hidrogeniones con el CH₄, produciéndose de esta forma menor cantidad de CH₄ entérico. Las estrategias pueden ser la incorporación de concentrados en la dieta (Hristov et al., 2013; Muñoz et al., 2015) o la mejora de la calidad de las pasturas. En este sentido existen varias evidencias de que la incorporación en las pasturas de forrajes de alta calidad nutricional (ej. leguminosas), conducen a una menor emisión de CH₄ por unidad de materia seca ingerida (MSI), comparado con la emisión obtenida en pasturas de baja calidad (Dini et al., 2012; Hammond et al., 2011); y

3) La eficiencia de utilización de alimento (o consumo residual de alimento, CRA) se ha reportado recientemente como una característica animal asociada con la emisión de CH₄ (Clark et al., 2001; Hegarty et al., 2007; Cassandro et al., 2013). Es así que animales más eficientes emitirían menos CH₄ entérico, aunque aún existe poca bibliografía al respecto y los mecanismos por los que esta emisión estaría reducida no son claros.

En el marco de esta Tesis se hará referencia puntualmente a dos de las estrategias de mitigación mencionadas: la mejora de la calidad del alimento en dietas netamente pastoriles y el uso de animales con bajo CRA que pueda afectar la emisión de CH₄ entérico. Ambas estrategias son relativamente novedosas y potencialmente aportarían una utilidad específica para el país.

2.4.1.1. Manejo de la alimentación

La cantidad y el tipo de ingesta de alimento afectan los procesos de fermentación en el rumen. En términos absolutos, las emisiones de CH₄ están directamente determinadas por el nivel de ingesta, es decir, cuanto mayor es la MSI, mayor será la emisión neta (g/d) (Moorby et al., 2015). Sin embargo, la emisión relativa es menor. Hay precedentes que afirman los efectos de la calidad de la dieta en la producción de CH₄ por unidad de consumo de alimento (Johnson y Johnson, 1995; Velazco et al., 2017). Si bien se conocen los efectos de la inclusión de granos en la dieta para reducir la metanogénesis (Lovett et al., 2005), hay estudios que sugieren que no es una estrategia efectiva cuando hay una alta asignación de material de forraje de alta calidad (Muñoz et al., 2015), por la elevada sustitución que producen. Por otra parte, la incorporación de forrajes de alta calidad nutricional conduce a menores emisiones de CH₄ por unidad de MSI (CH₄/kg MSI) en comparación con forrajes puros de baja calidad (McCaughey et al., 1999; Lee et al., 2004; Hammond et al., 2011). Estos últimos tienen un efecto positivo en la metanogénesis ruminal porque proporcionan niveles más altos de fibra que estimula la rumia y genera una menor velocidad de pasaje de entrada al rumen, así como una mayor tasa de fermentación con niveles más altos de ácido acético e hidrógeno (Hammond et al., 2011). Sin embargo, estos resultados provienen de estudios de investigación basados principalmente en cámaras

de respiración o en otras condiciones sin pastoreo. En estos casos, variables complejas como el pastoreo selectivo o la velocidad de alimentación no contribuyeron a los resultados obtenidos. En condiciones exclusivamente pastoriles existen pocos precedentes para evaluar los efectos de la incorporación de pasturas de alta calidad nutricional en las emisiones entéricas de CH₄.

2.4.1.2. Consumo residual de alimento

Recientes trabajos internacionales reportan que animales más eficientes en el uso del alimento ingerido (bajo consumo residual de alimento, CRA) emiten menos CH₄ entérico (Cassandro et al., 2013) y dicha característica ha sido identificada como una posible estrategia de mitigación de la emisión de CH₄ ya que la misma es proporcional a la cantidad de alimento consumido por un animal (Alemu et al., 2017). Los animales con valores bajos de CRA son más eficientes (consumen menos alimento de lo esperado considerando su peso corporal vivo y ganancia diaria; Hegarty et al., 2007) y producen menos CH₄ entérico (Basarab et al., 2013), aunque el mecanismo que vincula a estas dos variables no está claro. En este sentido, Hegarty et al. (2007) plantean que animales más eficientes producen un 25% menos de CH₄ entérico. Estas diferencias son atribuidas a variaciones entre animales en la ingesta de alimento, en la digestión, el incremento de calor, el recambio proteico, el comportamiento y actividad de alimentación, composición corporal y tasa de ganancia, peso vivo, prolificidad y varios otros factores actualmente desconocidos (Richardson y Herd, 2004). Por lo tanto, existen antecedentes que proponen la selección de animales en base a su CRA como una alternativa para mitigar las emisiones de CH₄ (Nkrumah et al., 2006; Hegarty et al., 2007; Basarab et al., 2013; Pickering et al., 2015; de Haas et al., 2017). Por el contrario, algunos autores que trabajan en condiciones de pastoreo no encontraron diferencias en las emisiones de CH₄ entre animales con CRA divergentes (Velazco et al., 2017). Hasta el momento, la investigación sobre este tema se ha limitado al estudio en ganado lechero y en raza Angus y se considera que las inconsistencias en los resultados pueden ser causadas por diferencias en el comportamiento ingestivo de los animales evaluados o en diferencias en la microbiota, o incluso en la evaluación de animales con CRA no tan divergentes. Considerando la potencialidad de esta característica animal como estrategia de mitigación de la emisión de CH₄ entérico es que se requiere mayor investigación que permita concluir fehacientemente en qué condiciones productivas puede ser evaluada como estrategia de mitigación.

2.5. DETERMINACIÓN DE CONSUMO EN PASTOREO

La determinación del consumo de materia seca (MSI) es de fundamental importancia para la nutrición animal de los rumiantes y para conocer la cantidad de nutrientes disponibles para las funciones de mantenimiento, producción y preñez del animal (NRC, 2001). En condiciones de pastoreo, el consumo de forraje es una información muy importante y necesaria para evaluar el estado nutricional de los rumiantes en diferentes sistemas. Sin embargo, la medición directa de la ingesta de forraje de rumiantes en pastoreo no es simple de implementar ya que no se dispone de metodologías fáciles y precisas. Este tipo de mediciones se basan mayoritariamente en la diferencia existente entre la estimación de forraje a través de corte y pesado previo al pastoreo (i.e. estimación de oferta) y la estimación del forraje posterior al mismo (i.e. estimación de rechazo). El tamaño de la superficie de corte o muestreo, la distribución de los puntos de muestreo, el número de muestras, la altura de corte así como el tipo de pastura generan importantes imprecisiones en esta metodología (Latinga et al., 2004).

El consumo de forraje de animales en pastoreo ha sido también estimado en forma indirecta utilizando diversos métodos basados en marcadores inertes externos e internos. Algunos ejemplos de marcadores externos son los n-Alcanos, el óxido de cromo (Cr_2O_3), tierras extrañas, el polietilenglicol, el óxido de titanio (TiO_2), y el iterbio. Entre los marcadores internos se han utilizado principalmente técnicas que requieren de disponer de los valores de la proteína fecal o de la composición de la fibra ingerida. Los marcadores externos son administrados por vía oral, donde la concentración del marcador se determina en muestras fecales para estimar la excreción fecal. Owens y Hanson (1992) afirman que un marcador inerte ideal debe tener las siguientes propiedades: no se puede absorber o ser afectado por el tracto digestivo, no debe influir en la fermentación ruminal, debe detectarse a bajas concentraciones, debe ser inerte y no debe ser tóxico. En general, una propiedad crucial de un marcador inerte es una recuperación alta y constante en las heces. En este sentido, Owens y Hanson (1992), usan el término de flujo (g/d) como forma de determinar el correcto tránsito del marcador en el tracto digestivo. Dicho flujo se calcula como el cociente entre la dosis y la concentración del marcador. Este cálculo asume que se ha logrado un estado de equilibrio del marcador en el rumen. Para ello, Glindemann et al. (2009) reportan que cuando el TiO_2 es utilizado como marcador externo, se logra un equilibrio entre el consumo y la excreción del TiO_2 en rumen en al menos 5 días luego de la administración inicial del marcador.

En el pasado, el Cr_2O_3 era uno de los marcadores inertes más comúnmente utilizados para predecir la excreción fecal en rumiantes en pastoreo (Glindemann et al., 2009). Sin embargo, estudios en rumiantes alimentados con forraje han demostrado que la recuperación fecal de Cr_2O_3 a menudo es muy variable entre los animales (93-113%), así como también se reportan variaciones diurnas significativas (Titgemeyer et al., 2001). Pese

a su mayor recuperación en heces (en comparación a la recuperación fecal del TiO_2 : 93-95%; Titgemeyer et al., 2001) el Cr_2O_3 no está aprobado como un aditivo de la dieta animal debido a sus efectos nocivos sobre la salud humana, cuando el mismo es inhalado.

El uso de n-alcanos (Dove y Mayes, 2006) también ha sido amplia y exitosamente utilizado para la determinación del consumo animal en pastoreo (Fajardo et al., 2015; Trujillo et al., 2013). Sin embargo, si el forraje presenta algún grado de heterogeneidad (varias especies y/o avance en estado fenológico) se generan algunas dificultades para la estimación del consumo. Para sobrellevar esta limitante se debe hacer un buen ajuste o valoración en laboratorio de la concentración de alcanos en las especies o partes de plantas que el animal consume.

Diversas comparaciones entre Cr_2O_3 y TiO_2 en cerdos (Jagger et al., 1992), en vacunos (Titgemeyer et al., 2001) y en ovejas (Myers et al., 2006) han demostrado que el TiO_2 es una alternativa al Cr_2O_3 como marcador para estudios en rumiantes. En el caso de Titgemeyer et al. (2001) reportaron en vacunos recuperaciones fecales de Cr_2O_3 y TiO_2 que no fueron diferentes estadísticamente entre sí (Cr_2O_3 : $P \geq 0,25$; y TiO_2 : $P \geq 0,17$), siendo la recuperación promedio de TiO_2 de 94,6% y la de Cr_2O_3 de 112,3%. Si bien estos valores reportados no muestran diferencias estadísticas, los autores enfatizan que se deben realizar un mayor número de trabajos que usen el TiO_2 como marcador externo, destacándose la inocuidad del mismo para la salud humana. De Souza et al. (2015) plantean que el TiO_2 es superior al Cr_2O_3 como marcador externo en vacas lecheras, ya que lograron un menor error en la estimación del forraje consumido.

Existen diferentes trabajos que reportan el uso de TiO_2 como marcador externo para la determinación de consumo animal, utilizándose a su vez diferentes especies, entre ellas aves, ovinos y vacunos. Originalmente, la técnica fue reportada por Short et al. (1996) quienes describen el procedimiento para el análisis de TiO_2 en los excrementos de pollo basados en modificaciones del procedimiento de Leone (1973). Short et al. (1996) fue posteriormente modificado por Titgemeyer et al. (2001) para el análisis de TiO_2 en muestras fecales bovinas. Otros estudios reportan el uso exitoso de la técnica en ratas (Krawielitzki et al., 1987), cerdos (Jagger et al., 1992), vacas lecheras (Hafez et al., 1988) y ovinos (Glindemann et al., 2009).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A partir de la información disponible y con el objetivo de generar información nacional para el desarrollo de factores de emisión que puedan ser empleados en la elaboración de los Inventarios Nacionales de GEIs, surgen algunas preguntas que aún no ha sido posible responder:

La inclusión de pasturas de alto valor nutricional en la dieta de vacunos de carne que permanecen en condiciones netamente pastoriles, ¿permitirá reducir las emisiones de CH₄ entérico?

El uso del CRA como variable de selección de vacunos de carne, ¿es válido como estrategia de mitigación de la emisión de CH₄ entérico?

4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

4.1. HIPÓTESIS

La mejora en la calidad de la pastura y el uso de CRA como variable de selección son estrategias promisorias para mitigar las emisiones de CH₄ entérico en vacunos de carne.

4.2. OBJETIVO GENERAL

Contribuir al proceso de intensificación sostenible de la producción ganadera nacional a través del estudio de posibles estrategias vinculadas con el manejo alimenticio y con características propias del animal (consumo residual de alimento, CRA) para la mitigación de las emisiones de CH₄ entérico.

4.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Cuantificar las emisiones de CH₄ entérico en vacunos de carne en condiciones pastoriles y comparar el nivel de emisión de animales consumiendo pasturas de diferente calidad nutricional.
- 2) Cuantificar las emisiones de CH₄ entérico en vacunos de carne con niveles de consumo residual de alimento (CRA) altamente contrastantes en condiciones de confinamiento.

5. ESTRATEGIA DE INVESTIGACIÓN

En base a las hipótesis y objetivos planteados se realizaron 2 experimentos.

En el **Experimento I** se evaluó la emisión de CH₄ entérico en vaquillonas Hereford consumiendo pasturas de diferente valor nutritivo. El mismo corresponde al objetivo específico número 1.

De este experimento surgieron dos artículos:

- 1) "Estudio de la variabilidad de la técnica de estimación de consumo en pastoreo a través del marcador externo Dióxido de Titanio". Dini, Y.; Ciganda, V.; Cajarville, C. Veterinaria (Montevideo), v., 54 (208), p.: 4-9, 2017 (ANEXO I).
- 2) "Using highly nutritious pastures to mitigate enteric methane emissions from cattle grazing systems in South America". Dini, Y.; Gere, J.I.; Cajarville, C.; Ciganda, V. Animal Production Science, . Article in Press. <https://doi.org/10.1071/AN16803> (ANEXO II).

En el **Experimento II** se evaluó la emisión de CH₄ entérico en novillos Hereford con valores contrastantes de consumo residual de alimento (CRA), en condiciones de confinamiento. El mismo corresponde al objetivo específico número 2.

De este experimento surgió el siguiente artículo: "Association between residual feed intake (RFI) and enteric methane emissions in Hereford steers". Dini, Y.; Cajarville, C.; Gere, J.I.; Fraga, M.; Fernández, S.; Pravia, M.I.; Navajas, E.; Ciganda, V. Traslational Animal Science, txy111, <https://doi.org/10.1093/tas/txy111> (ANEXO III).

6. MATERIALES Y MÉTODOS

Los procedimientos experimentales fueron realizados de acuerdo a los principios bioéticos y protocolos de supervisión propuestos por el Comité de Bioética del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA-Uruguay).

Los dos experimentos fueron realizados en vacunos de la raza Hereford pero difieren en que se trabajó sobre diferentes categorías (vaquillonas y novillos) y en los sistemas evaluados (pastoreo y confinamiento). En las Fig. 4a y 4b se presenta un esquema del protocolo experimental para la determinación de CH₄ entérico, utilizado en cada experimento.

Figura N° 4. Esquema del protocolo experimental del Experimento I

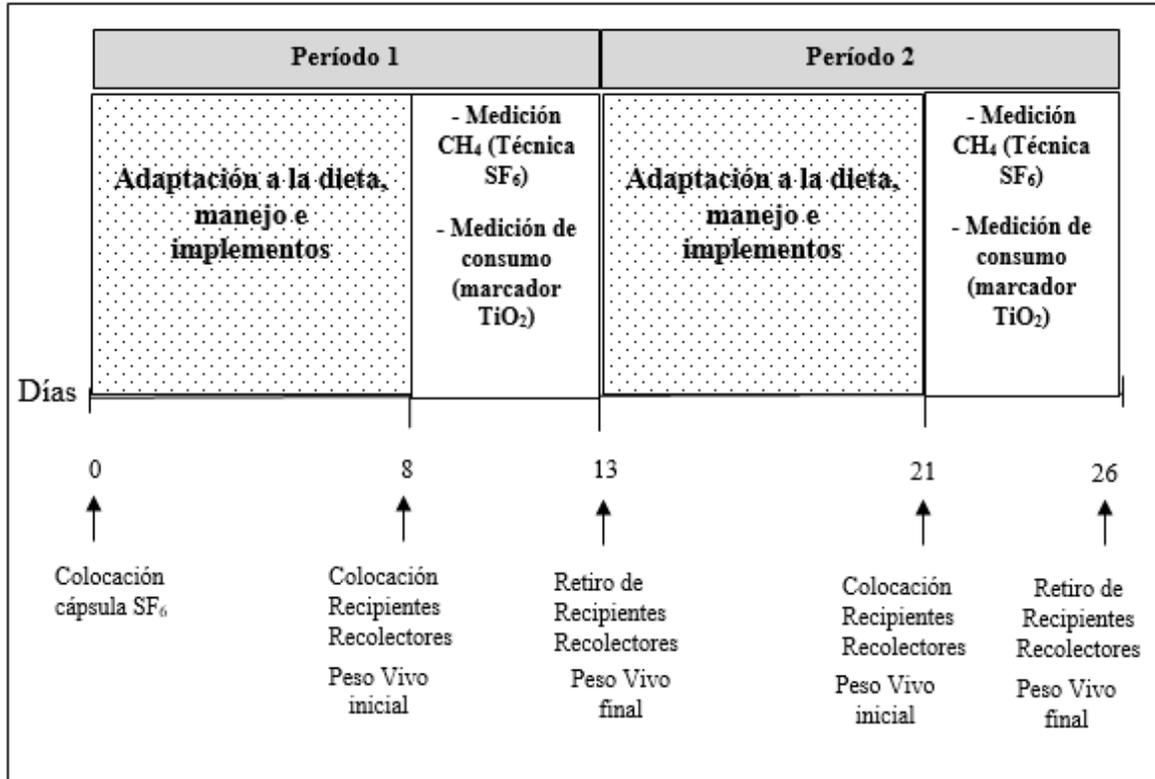
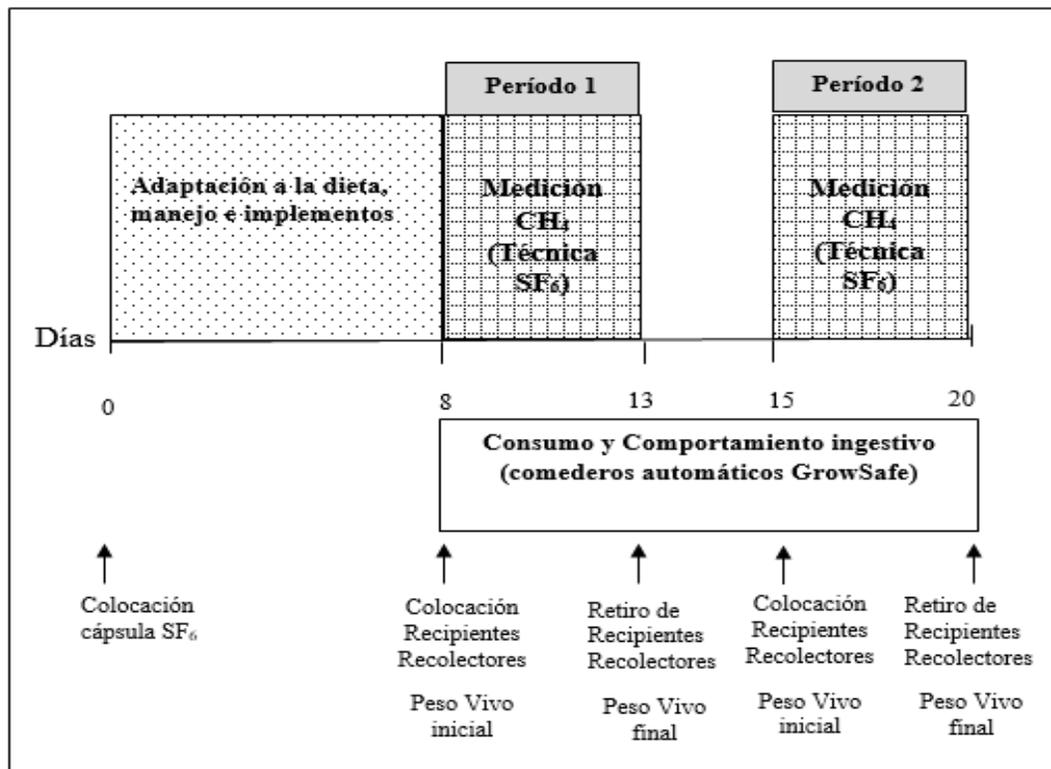


Figura N° 5. Esquema del protocolo experimental del Experimento II



6.1. EXPERIMENTO I

Este estudio se realizó en la Estación Experimental de INIA La Estanzuela (Colonia, Uruguay, Coordenadas GPS: Latitud 34°20,727'S, Longitud 57°42,665' O) durante el invierno y la primavera del año 2013.

6.1.1. Diseño experimental, animales, tratamientos y manejo

Se evaluaron 20 vaquillonas Hereford de 24 meses de edad promedio en dos momentos del año: invierno (11 junio -7 julio) y primavera (22 setiembre -18 octubre). Se utilizó un diseño experimental cruzado incluyendo dos tipos de pastura y dos períodos experimentales de 13 días: ocho días de adaptación a la dieta y cinco días de medición de consumo (TiO_2) y de emisión de CH_4 , en cada estación del año (ver Fig. 4). Los animales estuvieron permanentemente bajo condiciones de pastoreo y fueron agrupados en función del peso vivo (PV) inicial y asignados aleatoriamente ($n=10$) a cada tipo de pastura. Los animales fueron pesados al inicio y final de cada período experimental, como se observa en la Fig. 4.

El peso promedio de cada lote al inicio del período de mediciones fue de: $393,05 \pm 27,53$ y $397,65 \pm 26,47$ kg.

Los animales pastorearon dos pasturas de calidad contrastante, definida en base a la proteína cruda (PC), fibra detergente neutro (FDN) y digestibilidad *in vitro*. La composición química y la digestibilidad *in vitro* de ambas pasturas se presentan en la Tabla 1. Las mismas fueron denominadas como pastura de baja y alta calidad nutricional.

Tabla 1. Disponibilidad de forraje, composición química y digestibilidad *in vitro* de las pasturas utilizadas

	Pastura de baja calidad		Pastura de alta calidad	
	Invierno ¹	Primavera ²	Invierno ³	Primavera ⁴
Forraje disponible	4149 ± 127,9	3215 ± 187,6	2625 ± 195,5	2430 ± 138,5
MS (%)	48,2 ± 3,73	27,9 ± 1,17	19,6 ± 0,86	18,3 ± 0,48
PC (%)	9,41 ± 0,27	11,6 ± 0,23	21,1 ± 0,51	22,8 ± 0,35
FDA (%)	33,9 ± 0,30	30,3 ± 0,88	27,4 ± 0,79	26,8 ± 0,86
FDN (%)	70,4 ± 0,36	54,9 ± 1,54	42,4 ± 0,79	40,9 ± 0,94
C (%)	10,9 ± 0,28	11,4 ± 0,15	11,2 ± 0,29	9,82 ± 0,15
LDA (%)	8,37 ± 0,26	6,70 ± 0,69	9,08 ± 0,37	8,11 ± 0,42
MO (%)	89,0 ± 0,28	88,6 ± 0,15	88,8 ± 0,29	90,2 ± 0,15
EE (%)	0,99 ± 0,16	1,58 ± 0,13	1,30 ± 0,23	2,06 ± 0,13
CNF (%)	8,23 ± 0,35	20,5 ± 1,63	24,3 ± 0,85	24,4 ± 1,16
DMS (%)	35,1 ± 0,55	65,5 ± 1,06	63,3 ± 0,62	71,2 ± 0,14
DMO (%)	31,1 ± 0,47	56,8 ± 0,95	56,0 ± 0,59	64,0 ± 0,17

Forraje disponible (kg MS/ha) = forraje ofrecido; MS= materia seca; PC= proteína cruda; FDA= fibra detergente ácido; FDN= fibra detergente neutro; C=ceniza; LDA= lignina detergente ácido; MO= materia orgánica; EE= extracto etéreo; CNF= carbohidratos no fibrosos (CNF = 100 – (PC + C + FDN+ EE)); DMS= digestibilidad de la materia seca; DMO=digestibilidad de la materia orgánica, ^{1,2}Área asignada= 0,07 ha; ^{3,4}Área asignada= 0,15 ha. Los datos presentados son promedios por periodo y se presentan como media y desvío estándar.

La composición botánica invernal de la pastura de baja calidad nutricional se caracterizó por una predominancia de *Cynodon dactylon* (>60%) en una etapa de crecimiento

avanzado, *Lolium multiflorum*, *Paspalum dilatatum* y cantidades mínimas de *Trifolium repens* (<10%). En primavera, la pastura de baja calidad nutricional mostró una mayor prevalencia de *Lolium multiflorum* que en invierno (representando casi el 60% de las especies) con la presencia de bajas cantidades de *Cynodon dactylon*, *Paspalum dilatatum* y *Trifolium repens*. En la pastura de alto valor nutricional, tanto en invierno como en primavera, la composición botánica se caracterizó por una predominancia de *Trifolium pratense* (cerca del 50%) y el otro 50% compuesto por *Bromus aulecticus* y una mínima cantidad de *Trifolium repens*. El pastoreo se realizó en franjas diarias, con una asignación inicial del 5% del PV.

La disponibilidad inicial del forraje (>5cm) fue determinada diariamente en cada pastura mediante el corte en tres puntos aleatorios usando cuadros de 0,2 m². Las muestras fueron analizadas para determinar la composición química de ambas pasturas. Las mediciones para los dos tipos de pastura se realizaron en dos momentos del año: invierno y primavera.

6.1.2. Determinación de la emisión de CH₄

La determinación de CH₄ entérico fue realizada utilizando la técnica de trazado por hexafluoruro de azufre (SF₆) (Johnson et al., 1994) adaptada por Gere y Gratton (2010). Ocho días antes del comienzo de las mediciones (día 0, Fig. 4), a cada animal se le proporcionó una cápsula de permeación conteniendo SF₆, utilizando para ello un dosificador de plástico. La tasa de permeación de SF₆ de las cápsulas fue en promedio 6,65 mg/d (±1,08) y 6,59 mg/d (±1,08) en invierno y primavera, respectivamente. La recolección de los gases exhalados y eructados se realizó con dos recipientes recolectores de acero inoxidable de 0,5 L por animal, sostenidos por un bozal a la cabeza del animal. Los mismos fueron evacuados previo al inicio de cada período experimental (días 8 y 21, Fig. 4). Los recipientes recolectores permanecieron en el animal por 5 días, siguiendo el procedimiento reportado por otros autores (Dini et al., 2012; Pinares-Patiño et al., 2012; Savian et al., 2014; Amaral et al., 2016). Al final de cada período (días 13 y 26, Fig. 4), los recipientes recolectores fueron extraídos de cada animal y fue medida la presión post-muestreo. Los recipientes que tuvieran valores de 400-600 mb fueron considerados válidos de acuerdo a Gere y Gratton (2010) y Gere (2012) ya que aseguran muestras de calidad aceptable. Los que presentaron presiones <400 mb fueron descartados del experimento (menos del 10%). Cinco sub-muestras fueron extraídas de cada recipiente recolector y almacenadas en viales de 12-mL para la posterior determinación de concentraciones de CH₄ y SF₆. Luego, los recipientes recolectores fueron vaciados, limpiados con N₂, evacuados, y colocados en los animales (día 21, Fig. 4) para el segundo período de 5 días de recolección de gas.

La determinación de la concentración de CH₄ y SF₆ se realizó por cromatografía de gas (Perkin Elmer Clarus 600, INTA Castelar, Hurlingham, Argentina). Para el CH₄ se utilizó un detector de ionización de llama, para la determinación de SF₆ se utilizó un detector de captura de electrones. Después de obtener el análisis cromatográfico de las muestras, las emisiones de CH₄ por animal fueron calculadas utilizando la Ecuación 1:

$$\text{CH}_4 \text{ (g/d)} = \text{TP SF}_6 \text{ (g/d)} \times [\text{CH}_4]/[\text{SF}_6] \quad (1)$$

Donde TP SF₆ es la tasa de permeación de la cápsula de SF₆, [CH₄] y [SF₆] son las concentraciones de los gases (en ppm y ppt, respectivamente).

6.1.3. Consumo por la Técnica de TiO₂ y análisis químicos

Se realizó la determinación del consumo diario por animal (MSI, kg d⁻¹) en cada experimento utilizando la técnica del TiO₂ como marcador externo (Short et al., 1996). Dicha medición se realizó en los días 9 a 13 y 22 a 26 de cada período experimental (Fig. 4). Cada mañana, a cada animal le fue suministrada oralmente una cápsula de gelatina conteniendo 10 g de TiO₂ (14,5 g; 69% pureza). La administración de las cápsulas comenzó 8 días antes del inicio del período de muestreo para alcanzar un estado de estabilidad ruminal del TiO₂. Durante el período de mediciones se colectaron diariamente las heces de cada animal vía rectal. Las muestras fueron pesadas individualmente y se llevaron a estufa a 60°C durante 96 horas para la determinación del contenido de MS. A partir de ellas se obtuvo una muestra compuesta por animal en cada período de medición. La concentración de TiO₂ en heces se analizó utilizando el procedimiento descrito por Myers et al. (2004) en una submuestra de heces de cada muestra compuesta por animal. En las mismas se analizó además contenido de FDN, fibra detergente ácida (FDA), cenizas y lignina detergente ácida (LDA).

La MSI (kg d⁻¹) de cada animal se calculó de acuerdo a Corbett y Freer (1995) (Ecuación 2):

$$\text{MSI (kg d}^{-1}\text{)} = \text{MS fecal (kg d}^{-1}\text{)} \times 100/(100 - \text{DMS}) \quad (2)$$

La producción de MS fecal (kg d⁻¹) se calculó de acuerdo con Prigge et al. (1981) (Ecuación 3):

$$\text{MS fecal (kg d}^{-1}\text{)} = \text{dosis de TiO}_2 \text{ (mg d}^{-1}\text{)}/\text{concentración de TiO}_2 \text{ en heces (mg kg}^{-1}\text{)} \quad (3)$$

Las muestras de pasturas fueron pesadas y secadas a 60°C por 48h. Luego fueron molidas hasta pasar por un tamiz de 1 mm y analizadas para determinar sus respectivas composiciones químicas. Los contenidos de MS, ceniza y nitrógeno total fueron analizados

de acuerdo a AOAC (1990; ID método 934.01, ID 042.05, e ID 955.04, respectivamente). El FDN fue analizado con amilasa estable al calor y sulfito de sodio. La FDA y LDA fueron determinados según Van Soest et al. (1991), incluyendo ceniza residual. El extracto etéreo fue determinado extrayendo la grasa con éter de petróleo durante 4 h con un extractor de grasa Goldfish (Labconco Corp., Kansas City, MO, EE.UU.). La materia orgánica fue determinada como (100-%ceniza). La digestibilidad *in vitro* del forraje fue determinada de acuerdo con Terry y Tilley (1964) y la energía bruta mediante una bomba calorimétrica adiabática (Autobomb Gallenkamp; Loughborough, Leicester, United Kingdom).

La concentración de TiO₂ fecal fue determinada utilizando el procedimiento descrito por Short et al. (1996) mediante un espectrómetro (Thermo, modelo Genesys 10 µV, INIA La Estanzuela, Colonia, Uruguay).

6.1.3.1. Cálculo de ganancia o pérdida de peso a partir del consumo

La ganancia de peso diaria fue estimada para cada animal y período utilizando el programa NRC (2016), basándose en el consumo individual (estimado a través del marcador externo TiO₂), la calidad del forraje, edad, PV promedio y por período, y otras características de los animales experimentales (ej. raza, sexo). Para los animales que presentaron pérdida de peso, el mismo fue estimado mediante la ecuación de Davis et al. (1994) (Ecuación 4):

$$\mathbf{EMg = D1 \times PV^{0,75} \times ADWT1,119/kg} \quad (4)$$

Donde EMg es el requerimiento de energía metabolizable (EM) para ganancia de peso. Los valores de D1 se basaron en el tamaño del cuerpo (en el caso de los Hereford, el valor es 0,0686), de acuerdo con Davis et al. (1994). PV^{0,75} es el peso metabólico, ADWT es el cambio diario de peso promedio entre períodos de pesaje, y kg es la eficiencia de EM utilizada para la ganancia calculada de la manera propuesta por el autor. Las mediciones directas de PV no fueron utilizadas para la estimación de los cambios de peso, ya que la frecuencia de medición fue realizada en un intervalo muy corto (5 días).

La intensidad de emisión de CH₄ (g CH₄/kg PV) fue calculada para cada animal basándose en los datos de las emisiones diarias de CH₄ y las ganancias de peso diarias obtenidas del programa NRC (2016).

6.1.4. Análisis estadísticos

Los datos de consumo, PV, ganancia diaria, emisión de CH₄ e intensidad de emisión fueron analizados utilizando el procedimiento MIXED en SAS (versión 9.0; Instituto SAS, Cary, NC, EE.UU.), de acuerdo al siguiente modelo:

$$Y_{ijklm} = \mu + T_i + E_j + P(E)_{jk} + A_l + (T \times E)_{ij} + e_{ijklm}$$

Donde Y_{ijklm} es la variable dependiente, μ es el promedio general, T_i el efecto corregido del tratamiento (i = pastura de alta y baja calidad nutricional), E_j es el efecto corregido de la estación (j = invierno y primavera), $P(E)_{jk}$ es el efecto del nivel k del período anidado dentro el nivel j de estación (k = 1-4), A_l es el efecto animal (analizado como un efecto aleatorio; l = 1-20), $(T \times E)_{ij}$ es la interacción entre tratamiento y estación, y e_{ijklm} es el error residual.

Los promedios se compararon por el Test de Turkey-Kramer. Un test de normalidad fue aplicado a todas las variables (Shapiro y Wilk, 1965), la única variable que mostró una distribución diferente fue CH₄ por lo que se le realizó una transformación logarítmica (Log_{10}) para normalizarla. Estos datos normalizados fueron analizados con PROC MIXED como fue previamente descrito. Los resultados fueron considerados significativamente diferentes cuando $P < 0,05$, y una tendencia fue confirmada cuando $P < 0,10$.

6.2. EXPERIMENTO II

El estudio fue llevado a cabo en la Estación de Prueba de Kiyú de la Asociación de Criadores Hereford (San José, Uruguay, Coordenadas GPS: Latitud S 34°35,797', Longitud O 56°42,302'), en Diciembre 2014.

6.2.1. Diseño experimental, animales, tratamientos y manejo

Se parte de un lote de 112 novillos Hereford que formaron parte de un proyecto de tres años en el cual se generó una población de entrenamiento de 1000 animales para la implementación de selección genómica para consumo residual de alimento (CRA) en la raza Hereford uruguaya (Navajas et al., 2014). Los 112 animales correspondieron a una de las tres evaluaciones de CRA realizadas en el primer año del proyecto, los cuales provinieron de cinco establecimientos comerciales. La estimación del CRA se basó en mediciones del consumo individual realizadas en comederos automáticos GrowSafe en dos corrales durante 70 días, con acceso *ad libitum* al agua y al alimento. La evaluación de consumo se realizó luego de un período inicial de adaptación de 15 días a la dieta en comederos tradicionales, seguido de un período de adaptación de 15 días a los comederos

automáticos (Fig. 5). Los animales fueron alimentados dos veces por día con una ración totalmente mezclada (RTM) de ensilaje de sorgo, ensilaje de cebada, grano de maíz y núcleo proteico-mineral-vitamínico (Tabla 2).

Tabla 2. Ingredientes y composición de la ración totalmente mezclada (RTM)

Composición de la dieta, % (base fresca)	
Silo de sorgo	55
Silo de cebada	21
Grano de maíz	21
Núcleo proteico-mineral-vitamínico ¹	3
Composición química	
MS, %	44,95
PC, %	12,57
FDN, %	47,59
FDA, %	30,87
NDT, % ²	64,11
C, %	7,94
LDA, %	9,30
DMS, %	65,02
EB, Mcal/kg MS	3,93
EM, Mcal/kg MS ³	2,31

¹Harina de soja: 77%, Mycosorb®: 0,9%, Rumensin®: 0,3%,

Urea: 8,1%, CaCO₃: 7,3%, NaCl: 5,5%, Rovimix Feedlot®: 0,9%;

²NDT=Nutrientes digestibles totales = $96,03 - (1,034 \times \text{ADF, \%})$ (Alemu et al., 2017);

³EM, MJ/kg MS = $[(\text{NDT, \%}/100) \times 4,4 \text{ Mcal/kg NDT}] \times 4,184 \text{ MJ ED/Mcal} \times 0,82 \text{ MJ EM/MJ ED}$ (Alemu et al., 2017). Los valores presentados son promedios.

En todos los animales se midió durante un período de 70 días el consumo diario utilizando el sistema de comederos automáticos GrowSafe (Modelo 6000, GrowSafe Systems Ltd., Airdrie, Alberta, Canadá). La materia seca ingerida (MSI) se calculó como el promedio de los registros diarios ajustados por el porcentaje de materia seca. Una vez que se completó el período de medición de 70 días, los 112 animales se clasificaron según sus valores de CRA, calculados como la diferencia entre la MSI promedio diaria y la MSI esperada para el crecimiento y mantenimiento del animal, calculado en base al peso vivo (PV), tasa de crecimiento y composición corporal según lo propuesto por Basarab et al. (2003), basado en Koch et al. (1963).

En función de la clasificación de los animales por su CRA, se seleccionaron para este trabajo dos grupos de nueve novillos cada uno (18 animales) con valores de CRA extremos ($-0,78 \text{ kg} \pm 0,22 \text{ MSI/d}$ y $0,83 \pm 0,34 \text{ MSI/d}$). Ambos grupos permanecieron en condiciones de confinamiento durante 20 días más, se alimentaron con la misma dieta y siguieron el mismo régimen de alimentación ya especificado. Se continuaron las determinaciones de MSI por animal y se evaluaron características de comportamiento ingestivo (velocidad de alimentación, duración de cada comida, tamaño promedio de la comida, tiempo durante el cual el animal permanecía con la cabeza hacia abajo durante cada comida y tiempo total durante el cual el animal permanecía con la cabeza hacia abajo) durante el experimento.

Se utilizó un diseño estadístico experimental de medidas repetidas en el tiempo que incluyó dos tratamientos y dos períodos de medición de 5 días. Los tratamientos consistieron en los dos niveles contrastantes de CRA de los animales: BCRA (animales más eficientes) y ACRA (animales menos eficientes).

6.2.2. Determinación de la emisión de CH₄

Se utilizó la técnica de trazado por hexafluoruro de azufre (SF₆) (Johnson et al., 1994) modificada por Gere y Gratton (2010) para cuantificar las emisiones diarias de CH₄. Ocho días antes del comienzo de las mediciones de CH₄, ocho animales de cada grupo de CRA contrastante (un total de 16 animales) recibieron vía oral, una cápsula de permeación conteniendo hexafluoruro de azufre (SF₆) usando para ello un dosificador de plástico (Fig. 5, día 0). El animal restante de cada grupo se usó como control para determinar las líneas de base ambientales de CH₄ y SF₆ (utilizadas luego para el cálculo de la emisión de CH₄, Ecuación 1), por lo que no se le administró la cápsula de permeación de SF₆. Las tasas de permeación diaria (TP) de SF₆ de las cápsulas fueron en promedio: $5,98 \pm 2,33 \text{ mg/d}$ y $5,89 \pm 2,47 \text{ mg/d}$ en el grupo con BCRA y ACRA, respectivamente. La emisión de CH₄ entérico se midió en los 18 animales durante dos períodos consecutivos de cinco días cada uno, de

acuerdo a Dini et al. (2017). Los primeros ocho días fueron de adaptación de los animales al uso de los recipientes recolectores (RR) (utilizados para la determinación de la emisión de CH₄) y para la estabilización del nivel de SF₆ en el rumen. Durante el estudio, el PV de los animales se registró al principio y al final de cada período de medición (Fig. 5). El PV promedio fue $357 \pm 21,65$ kg y $334 \pm 43,11$ kg en el grupo BCRA y ACRA, respectivamente.

La recolección del gas exhalado y eructado se realizó utilizando dos RR de acero inoxidable de 0,5 L por animal. Al comienzo de cada período, estos recipientes se evacuaron, se limpiaron con N₂ y se utilizó un bozal para sujetarlos en la cabeza del animal. Al final de cada período, los RR se retiraron de los animales y se midió la presión posterior al muestreo. Los RR con valores de presión de 400 a 600 mb se consideraron válidos según Gere y Gratton (2010) y Gere (2012), ya que esta manipulación garantiza muestras de buena calidad. Los RR con valores de presión <400 mb se eliminaron del experimento. Se extrajeron cinco submuestras de cada RR válido, se almacenaron en vacutainers de 12 ml y se analizaron usando un cromatógrafo de gases (Agilent 7890A) con un detector de ionización de llama (FID) y un detector de captura de electrones (ECD) para determinar las concentraciones de CH₄ y SF₆, respectivamente. Después de obtener un análisis cromatográfico de las muestras, las emisiones de CH₄ por animal se calcularon usando la Ecuación 1.

6.2.3. Determinación de la cantidad de metanógenas totales

Luego de completar el segundo período de medición de CH₄, los 18 novillos se reincorporaron al lote original (112 animales) y pastorearon durante seis a diez meses hasta que alcanzaron el peso de faena (500 kg PV, edad promedio de faena: 607 ± 49 días). Durante el verano pastorearon sorgo (*Sorghum vulgare*) en etapa vegetativa, y fueron suplementados con ensilaje de sorgo, luego pastorearon avena (*Avena sativa*) y fueron suplementados con grano de maíz a razón de 6 kg/d hasta la faena. Durante la faena, se tomaron muestras del contenido ruminal y se guardaron a -80°C. Se extrajo el ácido desoxirribonucleico (ADN) y se realizó la cuantificación del número de copias del gen de la metil coenzima-M reductasa (mcrA) mediante la reacción cuantitativa en cadena de la polimerasa (qPCR). Este gen se usó como marcador funcional para enumerar metanógenas (Luton et al., 2002). Las reacciones (25µL) se realizaron en un termociclador BioRad CFX 96 usando Power SYBR™ Green PCR Master Mix (Applied Biosystems); los cebadores qmrcA-F y qmrcA-R, y las condiciones de reacción fueron las mismas que en Denman et al. (2007). Las curvas estándar para la cuantificación absoluta y la estimación de la

eficiencia se realizaron de acuerdo con Fraga et al. (2015). Se usaron tres réplicas de cada muestra de ADN (20 ng). Se cargó un control negativo (agua destilada estéril) en cada placa.

6.2.4. Análisis químicos

Diariamente se tomaron muestras de RTM, fueron pesadas y secadas a 60 °C durante 48 h. Luego fueron molidas hasta pasar por un tamiz de 1 mm y analizadas para determinar sus respectivas composiciones químicas. Los contenidos de MS, ceniza (C) y nitrógeno total (CP = N x 6,25) se analizaron de acuerdo con AOAC (1990, métodos ID 934.01, ID 942.05 e ID 955.04, respectivamente). FDN se analizó con amilasa estable al calor y sulfito de sodio. FDA y LDA se determinaron usando Van Soest et al. (1991), incluyendo ceniza residual. La digestibilidad *in vitro* se determinó de acuerdo con Tilley y Terry (1963) y la energía bruta mediante una bomba calorimétrica adiabática (Autobomb Gallenkamp; Loughborough, Leicester, United Kingdom).

6.2.5. Análisis estadísticos

Los datos se analizaron usando la versión 9.0 de SAS (SAS Institute, Inc., Cary, NC, EE. UU.). Los datos de consumo y emisiones de CH₄ se analizaron como medidas repetidas, utilizando el procedimiento PROC MIXED según el siguiente modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + P_j + (TxP)_{ij} + e_{ijk},$$

que incluyó el efecto fijo del tratamiento ($T_i = \text{BCRA y ACRA}$), el efecto fijo del período ($P_j = 1 \text{ y } 2$), su interacción [$ij (TxP)$], y el error residual (E_{ijk}).

La ganancia de peso diaria, las variables de comportamiento ingestivo y el número de copias por mg del gen *mcrA* obtenido del contenido ruminal se analizaron mediante el procedimiento PROC MIXED de SAS (SAS Inst. Inc., Cary, NC) de acuerdo con el siguiente modelo:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij},$$

que incluyó el efecto fijo del tratamiento ($T_i = \text{BCRA y ACRA}$).

Las medias de los tratamientos se compararon por el Test de Turkey-Kramer. Un test de normalidad fue aplicado a todas las variables (Shapiro y Wilk, 1965). Las variables que no mostraron una distribución normal fueron las copias de *mrcA*/mg y alguna variable de

comportamiento ingestivo, por lo que se le realizó una transformación logarítmica (Log_{10}) para normalizarla. Estos datos normalizados fueron analizados con PROC MIXED como fue previamente descrito. Los valores promedio se consideraron diferentes cuando $P \leq 0,05$ y tendieron a diferir si $0,05 \leq P \leq 0,10$.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. EXPERIMENTO I

La MSI diaria (kg/d) (estimada a partir del marcador externo TiO_2), tanto expresada en términos absolutos como en relación con el PV (% PV), peso metabólico ($\% \text{PV}^{0,75}$), proteína cruda ingerida (PCI, kg/d) y consumo diario de energía bruta (EBI, Mcal/d) fueron significativamente mayores en la pastura de alta calidad ($P < 0,05$), mientras que no se encontraron diferencias para la ingesta de FDN entre tratamientos ($P > 0,10$, Tabla 3). Si se encontraron diferencias significativas entre estaciones para el consumo de MS diario, PC, EB y FDN ($P < 0,05$) mientras que la interacción entre tratamiento y estación no fue significativa ($P > 0,10$).

Tabla 3. Efecto de la calidad de la pastura (tratamiento) y de la estación en el consumo

	Pastura de baja calidad		Pastura de alta calidad		Probabilidad		
	Invierno	Primavera	Invierno	Primavera	Tratamiento	Estación	Tratamiento* Estación
MSI	5,50 ± 0,49	10,1 ± 0,54	10,1 ± 1,40	12,8 ± 0,52	<,0001	<,0001	0,0959
MOI	4,10 ± 0,41	6,20 ± 0,23	6,50 ± 1,03	7,60 ± 0,31	0,0002	0,0016	0,1344
FDNI	3,90 ± 0,35	5,50 ± 0,24	4,30 ± 0,61	5,20 ± 0,22	0,5240	0,0003	0,1459
FDAI	1,90 ± 0,16	3,00 ± 0,14	2,70 ± 0,34	3,40 ± 0,16	0,0021	<,0001	0,1224
PCI	0,50 ± 0,05	1,20 ± 0,06	2,10 ± 0,29	2,90 ± 0,12	<,0001	<,0001	0,9074
EBI	22,0 ± 1,91	43,2 ± 2,20	40,9 ± 5,64	57,9 ± 2,40	<,0001	<,0001	0,2542
EBI/kg PV	0,10 ± 0,01	0,10 ± 0,004	0,10 ± 0,02	0,20 ± 0,01	<,0001	<,0001	0,1782
EBI/kg PV^{0.75}	0,30 ± 0,02	0,50 ± 0,02	0,50 ± 0,07	0,70 ± 0,03	<,0001	<,0001	0,1936
MSI %PV	1,50 ± 0,13	2,50 ± 0,11	2,80 ± 0,41	3,20 ± 0,12	<,0001	0,0013	0,0723
MSI %PV^{0.75}	6,70 ± 0,58	11,2 ± 0,52	12,3 ± 1,76	14,3 ± 0,54	<,0001	0,0004	0,0767
MOI %PV	1,10 ± 0,11	1,50 ± 0,05	1,80 ± 0,30	1,90 ± 0,07	0,0002	0,0537	0,1107
MOI %PV^{0.75}	4,90 ± 0,48	6,90 ± 0,21	7,90 ± 1,29	8,50 ± 0,33	0,0002	0,0260	0,1149
FDNI %PV	1,10 ± 0,09	1,40 ± 0,05	1,20 ± 0,18	1,30 ± 0,05	0,4208	0,0259	0,1561
FDNI %PV^{0.75}	4,70 ± 0,41	6,10 ± 0,22	5,20 ± 0,77	5,90 ± 0,22	0,4388	0,0101	0,1537
FDAI%PV	0,50 ± 0,04	0,80 ± 0,03	0,70 ± 0,10	0,90 ± 0,04	0,0019	0,0025	0,1054
FDAI%PV^{0.75}	2,20 ± 0,19	3,40 ± 0,13	3,30 ± 0,42	3,80 ± 0,16	0,0022	0,0008	0,1091

MSI= materia seca ingerida (kg/d); MOI= materia orgánica ingerida (kg/d); FDNI= fibra detergente neutro ingerida (kg/d); FDAI= fibra detergente ácido ingerida (kg/d); PCI= proteína cruda ingerida (kg/d); EBI= energía bruta ingerida (Mcal/d); EBI/kg PV= energía bruta ingerida por kilogramo de peso vivo (Mcal/kg); EBI/kg PV^{0.75}= energía bruta ingerida por kilogramo de peso metabólico (Mcal/kg); MSI %PV= materia seca ingerida como porcentaje del peso vivo (%); MSI%PV^{0.75}= materia seca ingerida como porcentaje del peso metabólico (%); MOI %PV= materia orgánica ingerida como porcentaje del peso vivo (%); MOI %PV^{0.75}= materia orgánica ingerida como porcentaje del peso metabólico (%); FDNI %PV= fibra detergente neutro ingerida como porcentaje del peso vivo (%); FDNI %PV^{0.75}= fibra detergente neutro ingerida como porcentaje de peso metabólico (%); FDAI %PV= fibra detergente ácido como porcentaje del peso vivo (%); FDAI %PV^{0.75}= fibra detergente ácido ingerida como porcentaje del peso metabólico (%).

La emisión de CH₄ expresada como porcentaje de la EBI (Y_m) fue mayor en los animales que pastorearon la pastura de baja calidad (P <0,05). Además, las emisiones expresadas por unidad de MSI tendieron a ser más altas la pastura de baja calidad (P = 0,055; Tabla 4). No se observaron diferencias entre tratamientos ni entre estaciones en las emisiones de CH₄ expresadas por unidad de materia orgánica ingerida, FDNI o FDAI (P > 0,10; Tabla 4).

Los animales que pastorean la pastura de baja calidad mostraron una ganancia de peso diario estimado de 0,27 kg/d y 0,41 kg/d, en invierno y en primavera respectivamente. Dichos resultados permitieron calcular una intensidad de emisión de 404 y 399 g CH₄/kg PV (13,75 vs 13,56 kg CO₂-eq), respectivamente. Sin embargo, los animales que pastorearon la pastura de alta calidad ganaron 0,80 kg/d y 1,4 kg/d en invierno y en primavera respectivamente, con una intensidad de emisión de 200 y 126 g CH₄/kg PV (6,81 vs 4,30 kg CO₂-eq), respectivamente.

Tabla 4. Efecto de la calidad de la pastura (tratamiento) y de la estación en la emisión de CH₄

	Pastura de baja calidad		Pastura de alta calidad		Probabilidad		
	Invierno	Primavera	Invierno	Primavera	Tratamiento	Estación	Tratamiento* Estación
Emisión	109 ± 7,10	164 ± 21,33	160 ± 10,84	177 ± 23,80	0,065	0,099	0,241
Emisión, log₁₀	2,00 ± 0,03	2,20 ± 0,05	2,20 ± 0,03	2,20 ± 0,06	0,032	0,086	0,127
Ym	7,90 ± 1,07	5,20 ± 0,77	7,00 ± 1,44	4,20 ± 0,59	0,043	0,006	0,352
Ym, log₁₀	0,90 ± 0,06	0,70 ± 0,06	0,80 ± 0,10	0,60 ± 0,07	0,031	0,019	0,398
CH₄/kg MSI	23,6 ± 3,19	16,8 ± 2,45	21,6 ± 4,89	14,3 ± 2,07	0,077	0,024	0,375
CH₄/kg MSI, log₁₀	1,30 ± 0,06	1,20 ± 0,06	1,30 ± 0,10	1,10 ± 0,07	0,055	0,067	0,353
CH₄/kg MOI	33,4 ± 5,27	27,4 ± 4,38	36,7 ± 8,09	24,0 ± 3,55	0,289	0,082	0,799
CH₄/kg MOI, log₁₀	1,50 ± 0,07	1,40 ± 0,05	1,50 ± 0,11	1,40 ± 0,07	0,184	0,204	0,629
CH₄/kg FDNI	33,5 ± 4,54	30,7 ± 4,64	51,6 ± 10,85	35,0 ± 5,10	0,244	0,141	0,687
CH₄/kg FDNI, log₁₀	1,50 ± 0,06	1,50 ± 0,05	1,70 ± 0,10	1,50 ± 0,07	0,390	0,331	0,894
CH₄/kg FDAI	66,5 ± 9,89	55,6 ± 8,37	79,2 ± 13,79	53,2 ± 8,48	0,863	0,094	0,960
CH₄/kg FDAI, log₁₀	1,80 ± 0,07	1,70 ± 0,05	1,90 ± 0,09	1,70 ± 0,07	0,806	0,210	0,940
CH₄/kg PV	404 ± 75,20	399 ± 122,15	200 ± 98,75	126 ± 15,18	0,010	0,715	0,117

Emisión = emisión diaria de CH₄ (g/d); Ym= emisión de CH₄ como porcentaje de la EBI (%); CH₄/kg MSI= emisión de CH₄ por kilogramo de materia seca ingerida (g/kg); CH₄/kg MOI= = emisión de CH₄ por kilogramo de materia orgánica ingerida (g/kg); CH₄/kg FDNI= emisión de CH₄ por kilogramo de fibra detergente neutro ingerida (g/kg); CH₄/kg FDAI= emisión de CH₄ por kilogramo de fibra detergente ácido ingerida (g/kg); CH₄/kg PV= intensidad de emisión.

A partir de los resultados obtenidos se puede decir que el mayor consumo de MS observado en los animales que pastorearon la pastura de alta calidad puede explicarse por el menor contenido de FDN y un mayor contenido de PC, asociado con una mayor digestibilidad. Además, los animales que pastorearon la pastura de baja calidad mostraron un consumo relativamente bajo de $\sim 2\%$ de PV, mientras que los animales que pastorearon en la pastura de alta calidad mostraron una ingesta cercana al 3% de PV. Estos resultados explicarían las mayores emisiones en términos absolutos (g/d) que se observaron para el tratamiento de alta calidad. No hubo diferencias en FDNI, lo que indica que la ingesta fue limitada por la concentración de FDN en la pastura, que fue similar a la estimación máxima de FDN basada en PV (Mendoza et al., 2003). No se debe desconocer el hecho de que en este estudio no puede afirmarse si la composición botánica afectó los resultados o si la presencia de compuestos secundarios afectó la ingesta de materia seca y las emisiones de CH_4 . El mayor consumo de MS en la pastura de alta calidad resultó en emisiones de CH_4 (g/d) 24% más altas que las emisiones en el tratamiento de baja calidad, lo cual fue consistente con los resultados de Moorby et al. (2015). Los componentes químicos de las pasturas, como el extracto etéreo, CNF, FDN, CP y digestibilidad, también pueden haber tenido un impacto notable en las emisiones de CH_4 . En este trabajo, la pastura de alta calidad presentó un contenido de extracto etéreo 30% más alto que la pastura de baja calidad, tanto en invierno como en primavera. Los CNF fueron más de 3 veces superiores en invierno y 30% superior en primavera que en las pasturas de baja calidad. Los valores de Ym obtenidos fueron similares a los reportados en estudios previos realizados en condiciones similares pero con vacas lecheras (Dini et al., 2012) y en pastoreo de raigrás con diferentes intensidades y tipos de pastoreo (Savian et al., 2014). Las emisiones de CH_4 expresadas por unidad de consumo ($\text{CH}_4/\text{kg MSI}$) o como porcentaje del EBI (Ym) fueron 11% y 14% inferiores, respectivamente, en los animales que pastorearon la pastura de alta calidad, en comparación con los de baja calidad. Tal reducción de emisiones obtenida en este estudio mediante el uso de pasturas de alta calidad coincide con el rango reportado de reducciones de $12\text{-}25\%$ encontradas en estudios previos pero para situaciones no pastoriles (McCaughy et al., 1999; Lee et al., 2004; Hammond et al., 2011). La pastura de alta calidad utilizada en este trabajo fue similar a las pasturas templadas de alta calidad utilizadas por los agricultores en Uruguay (Mieres et al., 2004). Existen varios estudios que destacan la incorporación de granos en dietas animales como una estrategia para reducir las emisiones de CH_4 por unidad de consumo (Jiao et al., 2014; Muñoz et al., 2015). Sin embargo, de este estudio, surge que es posible reducir estas emisiones en sistemas netamente pastoriles a través de la mejora en la calidad del forraje ofrecido. Estos resultados se confirman con valores de intensidad de emisión (g $\text{CH}_4/\text{kg PV}$) cuatro veces inferior en los animales que pastoreaban pasturas de alta calidad, en comparación con los animales que pastoreaban pasturas de baja calidad. Además, estos resultados sugieren que para los sistemas de producción de carne, la emisión de CH_4 debe expresarse por kg PV más que en términos absolutos. Por lo tanto, el uso potencial de la calidad de las pasturas como una estrategia para mitigar las emisiones

de CH₄ entérico plantea la necesidad de enfatizar y fortalecer la investigación para determinar en qué medida las emisiones se pueden reducir a través de esta alternativa.

7.2. EXPERIMENTO II

Los animales menos eficientes (Alto CRA) presentaron un consumo de MS y de EB mayor que los animales más eficientes (Bajo CRA), pero no hubo diferencias en la GD (media = 0,82 kg/d; P= 0,923) entre los grupos evaluados. En relación a las variables de comportamiento ingestivo, los animales más eficientes permanecieron menos tiempo comiendo (P <0,0001) respecto a los ACRA (Tabla 5). Además, el tiempo en el que el animal permaneció con la cabeza baja tendió a ser más bajo en animales BCRA (P <0,029), mientras que los valores de la tasa de consumo tendieron a ser más altos (P <0,074). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en el tamaño promedio de cada comida (media = 0,90; P = 0,34), en la cantidad de comidas (media = 13,21; P = 0,63) ni en el tiempo que permanecieron con la cabeza baja en cada comida (media = 347,76; P = 0,12).

Tabla 5. Consumo, ganancia diaria y comportamiento ingestivo en novillos de BCRA y ACRA

	Tratamiento			
	BCRA	ACRA	ESM	P-valor
	(alta eficiencia)	(baja eficiencia)		
Consumo, kg MS/d	9,33	10,62	0,326	0,014
EBI, Mcal/d	37,14	42,26	1,315	0,014
GD, kg/d	0,83	0,80	0,190	0,923
Velocidad de alimentación, g/seg	4,05	2,75	0,482	0,074
Velocidad de alimentación, log ₁₀	1,32	0,98	0,120	0,062
Tiempo en que permanecieron comiendo, seg	11802	15404	397,7	<,0001
Tamaño promedio de la comida, kg	0,81	0,98	0,120	0,342
Tamaño promedio de la comida, log ₁₀	-0,23	-0,12	0,121	0,549
Comidas por día	12,81	13,60	1,135	0,627
Cabeza hacia abajo/comida, seg	265,0	430,5	71,47	0,121
Cabeza hacia abajo/comida, log ₁₀	5,47	5,89	0,190	0,141
Cabeza hacia abajo total, seg	3024	4519	440,9	0,029

MSI = materia seca ingerida; EBI = energía bruta ingerida; GD = ganancia diaria promedio. Comportamiento ingestivo: Cabeza hacia abajo/comida, seg= Tiempo durante el cual el animal permanecía con la cabeza hacia abajo durante cada comida; Cabeza hacia abajo total, seg= tiempo total durante el cual el animal permanecía con la cabeza hacia abajo. Los valores son promedio por tratamiento (n = 8/tratamiento).

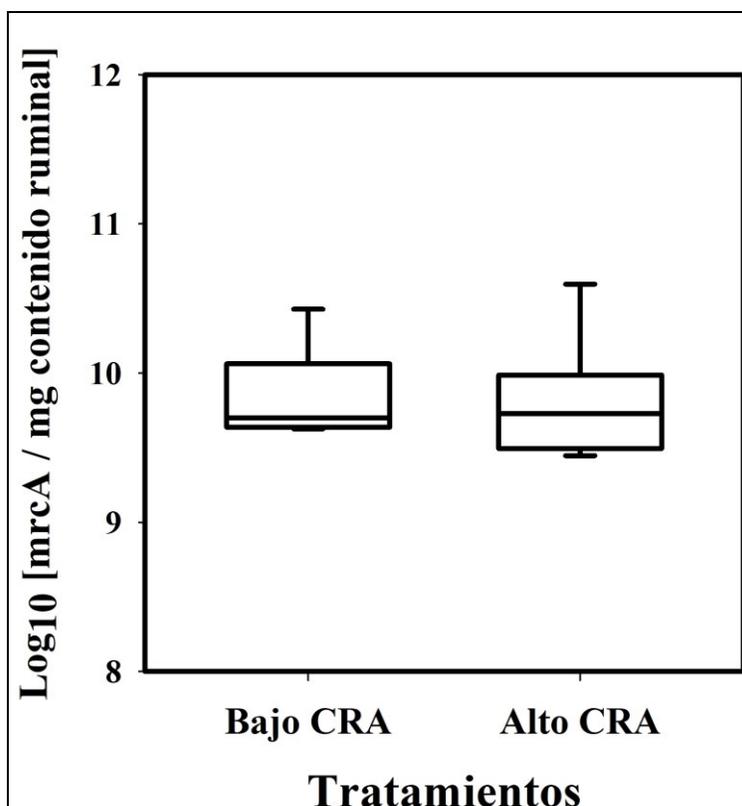
Los animales más eficientes (BCRA) produjeron 26,8% menos CH₄ en términos absolutos (g/d) así como un menor rendimiento de CH₄ (27,9%) cuando se expresa por unidad de consumo de MS (g/kg MSI) o como porcentaje de la energía bruta ingerida (26,7% menos) en comparación con animales menos eficientes (ACRA) (Tabla 6). No se observaron diferencias en el total de metanógenas entre tratamientos, siendo el promedio del número de copias del gen mcrA de 9,82 log₁₀ unidades; P=0,86 (Fig. 6). La eficacia de amplificación de la reacción de qPCR calculada a partir de la curva estándar fue del 96,6% con un R² = 0,99, lo que garantiza la precisión del método.

Tabla 6. Emisión de CH₄ en novillos de BCRA y ACRA

	Tratamiento		ESM	P-valor		
	BCRA (alta eficiencia)	ACRA (baja eficiencia)		Tratamiento	Período	Trat*Per
Emisión, g/d	193,86	264,92	15,92	0,009	0,423	0,911
CH ₄ /kg MSI, g/kg	20,34	28,12	1,76	0,021	0,107	0,390
Y _m , %	6,72	9,17	0,58	0,027	0,102	0,391
CH ₄ /kg FDNI, g/kg	42,99	59,19	3,73	0,024	0,103	0,396
CH ₄ /kg FDAI, g/kg	65,41	92,04	5,69	0,015	0,106	0,398

Emisión= emisión diaria de CH₄; CH₄/kg MSI= emisión de CH₄ por kg de materia seca ingerida; Y_m= methane yield; CH₄/kg FDNI= emisión de CH₄ por kg de fibra detergente neutra ingerida; CH₄/kg FDAI= emisión de CH₄ por kg de fibra detergente ácida ingerida. Los valores son promedio por tratamiento (n = 8/tratamiento).

Figura N° 6. Número de copias del gen mrcA para novillos BCRA y ACRA



A partir de los resultados obtenidos en este trabajo, se confirmó que los animales más eficientes (BCRA) consumen una menor cantidad de alimento y dedican un 23% menos de tiempo a comer. El menor tiempo de consumo es consistente con los hallazgos informados por Basarab et al. (2013), y pueden indicar que la mayor eficiencia está asociada con un menor gasto de energía en actividades de alimentación. Además, los animales BCRA (más eficientes; CRA promedio: -0,78 kg MSI/d), emitieron un 27% menos de CH₄ que los animales ACRA (CRA promedio: 0,83 kg MSI/d).

En simultáneo con un menor tiempo dedicado a la ingesta se evidenció una fuerte tendencia a una mayor tasa de ingestión de los animales más eficientes (BCRA). Los animales con mayores tasas de ingestión también tienen tasas más rápidas de paso de partículas en el rumen, y esto no necesariamente está asociado a una menor digestibilidad, al menos para dietas de alta calidad (Pérez-Ruchel et al., 2013). En nuestro estudio, una mayor tasa de pasaje de las partículas del rumen podría explicar la menor emisión de CH₄ en los animales BCRA (Nkrumah et al., 2006).

A pesar de los resultados promisorios observados en este trabajo, la relación entre CRA y emisiones no está todavía clara y diferentes asociaciones entre CRA y las emisiones de CH₄ han sido reportadas previamente. En un estudio reciente, Velazco et al. (2017) encontraron una mayor MSI predicha y mayores emisiones de CH₄ en animales con menor CRA en Angus en condiciones de pastoreo. Aunque estos resultados se atribuyeron sólo a la calidad de la dieta, sería necesario tener en cuenta otras variables que afectan el CRA, incluidas las características de comportamiento ingestivo (no informadas en el estudio mencionado anteriormente) y el tipo y las condiciones de alimentación (pastoreo vs. confinamiento). Además, la interacción del genotipo y el medio ambiente también podría explicar las diferencias en los resultados informados, como se identificó previamente por Durunna et al. (2011), ya que Velazco et al. (2017) trabajó con ganado Angus en condiciones de pastoreo, mientras que nuestro estudio se realizó con novillos Hereford en condiciones de confinamiento.

En este trabajo, las diferencias en las emisiones de CH₄ no pudieron asociarse directamente con las diferencias en la cuantificación del número de copias del gen *mcrA*, lo que también se observó en estudios previos (Zhou et al., 2011; Danielsson et al., 2012; Rira et al., 2016), lo que indica que los animales con bajos valores de CRA no presentan necesariamente una menor población de Archeas. Sin embargo, es necesario señalar que en nuestro estudio el contenido ruminal se colectó al momento de la faena, 6-10 meses luego de finalizado el experimento. Wallace et al. (2014) estudiaron la relación entre microbioma y emisiones de CH₄ en ganado de carne que consumía diferentes dietas y observaron que la tasa archea/bacteria en animales vivos era similar a la post mortem, y también la correlación entre archea/bacteria y emisión de CH₄, con independencia del dieta. Dado que el CRA es una condición intrínseca del animal, las diferencias entre los grupos de BCRA y ACRA en las

emisiones de CH₄ y en las características del microbioma deberían persistir a lo largo de la vida con independencia de la dieta consumida. Sin embargo, algunos autores han sugerido que la relación entre CRA y la emisión de CH₄ es una condición dependiente de la dieta (Velazco et al., 2017). De acuerdo con Jones et al. (2011), las vacas con CRA más bajos produjeron menos CH₄ que las de CRA alto solo cuando fueron alimentadas con pasto de alta calidad. En base a la escasa información existente sobre la relación entre CRA, emisión de CH₄ y el microbioma, es necesario considerar que las diferentes dietas consumidas podrían haber diluido la asociación entre las poblaciones de Archea y las emisiones de CH₄ entre los grupos de CRA evaluados.

Existen estudios recientes que cuestionan el uso de CRA como una estrategia para mitigar las emisiones entéricas de CH₄ (Jones et al., 2011; Alemu et al., 2017; Velazco et al., 2017). Sin embargo, debe tenerse en cuenta que en estos estudios previos, las poblaciones utilizadas no presentaron una fuerte divergencia en CRA, lo que puede haber afectado los resultados en relación con la emisión de CH₄. Jones et al. (2011) informaron que las poblaciones evaluadas tenían valores promedio de CRA de -0,69 vs. 0,68 kg/d, mientras que Alemu et al. (2017) informaron valores de -0,25 vs. 0,29. En nuestro estudio, los animales evaluados presentaron un mayor contraste en los valores de CRA (-0,78 vs. 0,83 kg / d). Además, Nkrumah et al. (2006) encontraron diferencias en las emisiones de CH₄ con poblaciones de animales que muestran un alto contraste de CRA (-1,18 vs. 1,25 kg/d).

Los resultados del presente trabajo muestran que los animales con menor CRA (BCRA, más eficientes) emiten menos CH₄, lo que indica que la selección según el nivel de CRA es una estrategia de mitigación prometedora, que se puede utilizar de forma sinérgica con el manejo de los componentes de la dieta. Trabajos futuros deberían investigar la asociación entre el CRA y la cantidad y actividad de los metanógenas, así como entre estos y la emisión de CH₄. Esto permitirá la evaluación del potencial y el alcance del CRA en la reducción de las emisiones de CH₄.

8. CONCLUSIONES

Las emisiones de CH₄ entérico fueron significativamente menores (14%) en los animales que pastoreaban en la pastura de alta calidad. Por lo tanto, se considera que el hecho de mejorar la calidad de las pasturas puede ser considerada como una estrategia válida de mitigación para las emisiones de GEI en los sistemas de producción pastoriles.

La selección según el nivel de CRA parece ser una estrategia de mitigación prometedora, ya que, en una población con valores contrastantes, los animales con bajo CRA emitieron 27% menos CH₄. Al menos en animales en confinamiento, esta estrategia se puede utilizar de forma sinérgica con la mejora de la calidad de la dieta.

Los resultados obtenidos permiten concluir que manejando la calidad de la pastura e incluyendo en nuestros rodeos animales más eficientes (bajo CRA) es posible reducir las emisiones de los rumiantes y por ende las emisiones netas del país, con la ventaja que ambas estrategias van a favor del incremento en la productividad animal. Para evaluar los límites del potencial de mitigación de ambas estrategias son necesarios más estudios para evaluar, por ejemplo, los efectos de diferentes mezclas o especies forrajeras en la metanogénesis ruminal, combinaciones de dietas, y como interactúa el efecto calidad de pastura con el bajo CRA.

9. IMPLICANCIAS

Con la finalización de este Proyecto Doctoral se pretende contribuir con resultados nacionales para la Elaboración del Inventario Nacional de Gases de Efecto Invernadero que elabora MGAP periódicamente, para informar las emisiones del País en los diferentes sectores. A partir de la información publicada en los artículos asociados a esta Tesis se pretende dar difusión nacional e internacional de los factores de emisión (Y_m) obtenidos en nuestras condiciones como forma de respaldar el mencionado inventario.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alemu A, Vyas W, Manafiazar G, Basarab J.A, Beauchemin K. (2017). Enteric methane emissions from low and high residual feed intake beef heifers measured using Green Feed and respiration chamber techniques. *J. Anim. Sci* 95: 3727–3737.

Amaral G, David D, Gere J, Savian J, Kohmann M, Nadin L, Sánchez Chopa F, Bayer C, Carvalho P. (2016). Methane emissions from sheep grazing pearl millet (*Penisetum americanum* (L.) Leeke) swards fertilized with increasing nitrogen levels. *Small Ruminant Research* 141, 118–123.

A.O.A.C. (1990). Association of Official Analytical Chemist. Official Methods of analysis. 15th ed. AOAC, Arlington VA. 770-771.

Basarab J, Beauchemin K, Baron V, Ominski K, Guan L, Miller S, Crowley J. (2013). Reducing GHG emissions through genetic improvement for feed efficiency: effects on economically important traits and enteric methane production. *Animal* 7 (s 2): 303–315.

Basarab J, Prince M, Aalhus J, Okine E, Snelling W, Lyle K. (2003). Residual feed intake and body composition in young growing cattle. *Can J. Anim.Sci.* 83: 189-204.

Berger, L. (2011). Emisiones de óxido nitroso producidas por la actividad ganadera en el Uruguay en condiciones de pastoreo. Tesis de grado, Facultad de Ciencias, UdelaR. 38p.

Beretta V, Simeone A, Bentancur O. (2013). Manejo de la sombra asociado a la restricción del pastoreo: efecto sobre el comportamiento y performance estival de vacunos. *Agrociencia* 17: 137-140.

Blas C, García Rebollos P, Cambra López M, Torres A. (2008). Contribución de los Rumiantes a las emisiones de gases con efecto invernadero [En línea]. Consultado 10 Mar 2018. Disponible en: <http://www.produccion-animal.com.ar/sustentabilidad/89gases.pdf>.

Carlino, H. (2016). El Acuerdo de París y sus Implicaciones para América Latina y el Caribe. [en línea]. Consultado 30 Jun 2018. Disponible en: http://www.pnuma.org/cambio_climatico/publicaciones/Acuerdo_de_Paris-Implicaciones_en_ALC_-_Estudio_1.pdf

Cassandro M, Mele M, Stefanon B. (2013). Genetic aspects of enteric methane emission in livestock ruminants. *Ital. J. Anim. Sci* 12: 450–458.

Church, D. (1990). Fundamentos de nutrición y alimentación de animales. Ed. Limusa. Zaragoza, España. 438 p.

Clark H, Kelliher F, Pinares-Patiño C. (2011). Reducing CH₄ Emissions from Grazing Ruminants in New Zealand: Challenges and Opportunities. *Asian-Australasian Journal Animal Science* 24: 295-302.

Clark H, de Klein C, Newton P. (2001). Potential management practices and technologies to reduce nitrous oxide, methane and carbon dioxide emissions from New Zealand agriculture. A report prepared for the Ministry of Agriculture and Forestry. [en línea]. Consultado 14 Jul 2018. <http://www.maf.govt.nz/mafnet/rural-NZ/sustainable-resource-use/climate/green-hause>.

Corbett J, Freer M. (1995). Ingestion et digestion chez les ruminants au pâturage. In *Nutrition des ruminants domestiques, ingestion et digestion*. Eds. R. Jarrige, Y. Ruckebusch, C. Demarquilly, M.-H. Farce, and M. Journet. INRA Editions, Paris, France. pp: 871–900

Dove H, Mayes R. (2006). Protocol for the analysis of n-alkanes and other plant-wax compounds and for their use as markers for quantifying the nutrient supply of large mammalian herbivores. *Nature Protocols*, 1 (4): 1680-1697.

Davis K, Tess M, Kress D, Doornbos D, Anderson D. (1994). Life cycle evaluation of five biological types of beef cattle in a cow-calf range production system: I. Model development. *Journal of Animal Science* 72, 2585–2590.

Delagarde R, Peyraud J, Delaby L. (1999). Influence of carbohydrate or protein supplementation on intake, behaviour and digestion in dairy cows strip-grazing low-nitrogen fertilized perennial ryegrass. *Anim* 48:81-96.

Denman S, Tomkins N, McSweeney C. (2007). Quantitation and diversity analysis of ruminal methanogenic populations in response to the antimethanogenic compound bromochloromethane. *FEMS Microbiol. Ecol* 62: 313–322.

De Souza J, Batstel F, Welter K, Mendes Silva M, Fleury Costa D, Portela Santos F. (2015). Evaluation of external markers to estimate fecal excretion, intake, and digestibility in dairy cows. *Trop Anim Health Prod* 47:265–268.

Dini Y, Gere J.I, Cajarville C, Ciganda V. (2017). Using highly nutritious pastures to mitigate enteric methane emissions from cattle grazing systems in South America. *Animal Production Science*, . Article in Press. DOI: 10.1071/AN16803

Dini Y, Gere J, Briano C, Manetti M, Juliarena P, Picasso V, Gratton R, Astigarraga L. (2012). Methane Emission and Milk Production of Dairy Cows Grazing Pastures Rich in Legumes or Rich in Grasses in Uruguay. *Animals* 2, 288-300.

Dixon W. (1951). Ratios involving extreme values. *J Ann Math Stat* 22: 68-78.

Fajardo M, Mattiauda D, Motta G, Genro T, Meikle A, Carriquiry M, Chilbroste P. (2015). Use of mixed rations with different access time to pastureland on productive responses of early lactation Holstein cows. *Livestock Science*, 181: 51-57.

Félix A, Repetto JL, Hernández N, Pérez-Ruchel A. (2017). Restricting the time of access to fresh forage reduces intake and energy balance but does not affect the digestive utilization of nutrients in beef heifers. *Anim. Feed Sci. Technol.* 226:103-112.

Forbes M. (2007). A personal view of how ruminant animals control their intake and choice of food: minimal total discomfort. *Nutr Res* 20: 132–146.

Fraga M, Fernández S, Cajarville C, Martínez M, Abin-Carriquiry J, Zunino P. (2015). *In vitro* modulation of rumen microbiota and fermentation by native microorganisms isolated from the rumen of a fed exclusively on pasture bovine. *Ann. Microbiol.* 65:2355–2362.

Gerber P, Hristov A, Henderson B, Makkar H, Oh J, Lee C, Meinen R, Montes F, Ott T, Firkins J, Rotz A, Dell C, Adesogan A, Yang W, Tricarico J, Kebreab E, Waghorn G, Dijkstra J, Oosting S. (2013). Technical options for the mitigation of direct methane and nitrous oxide emissions from livestock: a review. *Animal.* 7:220–234.

Gere J. (2012). La técnica de trazado por SF₆ para medir emisiones de metano de rumiantes en pastoreo: desarrollos metodológicos y algunas aplicaciones. PhD Thesis, Faculty of Exact Sciences, Tandil, Argentina.

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.

Glindemann T, Tas B, Wang C, Alvers S, Susenbeth A. (2009). Evaluation of titanium dioxide as an inert marker for estimating faecal excretion in grazing sheep. *Anim Feed Sci Technol.* 152: 186-197.

Grainger C, Beauchemin K. (2011). Can enteric methane emissions from ruminants be lowered without lowering their production? *Anim. Feed Sci. Technol.* 166–167, 308–320.

Hafez S, Junge W, Kalm E. (1988). Estimate of digestibility in dairy cows using an indicator method in comparison to the Hohenheimer feed value test. *Archiv fur Tierernahrung*, 38 (10): 929-945.

Hammond K, Burke J, Koolaard J, Muetzel S, Pinares-Patiño C, Waghorn G. (2013). Effects of feed intake on enteric methane emissions from sheep fed fresh white clover

(*Trifolium repens*) and perennial ryegrass (*Lolium perenne*) forages. Anim. Feed Sci. Technol. 179:121–132.

Hammond K, Hoskin S, Burke J, Waghorn G, Koolaard J, Muetzel S. (2011). Effects of feeding fresh white clover (*Trifolium repens*) or perennial ryegrass (*Lolium perenne*) on enteric methane emissions from sheep. Anim. Feed Sci. Technol. 166: 398-404.

Hegarty R, Goopy J, Herd R, McCorkell B. (2007). Cattle selected for lower residual feed intake have reduced daily methane production. J. Anim. Sci. 85:1479–1486.

Hristov A, Oh J, Lee C, Meinen R, Montes F, Ott T, Firkins J, Rotz A, Dell C, Adesogan A, Yang W, Tricarico J, Kebreab E, Waghorn G, Dijkstra J, Oosting S. (2013). Mitigation of greenhouse gas emissions in livestock production – a review of technical options for non-CO₂ emission. In (ed. P Gerber, B Henderson and H Makkar). FAO, Rome, Italy.

IPCC. (2001). Cambio climático 2001: Informe de síntesis/Impactos, adaptación y vulnerabilidad. [en línea]. Consultado 10 Jun 2018. <https://www.ipcc.ch/pdf/climate-changes-2001/impact-adaptation-vulnerability/impact-spm-ts-sp.pdf>

Jagger S, Wiseman J, Cole DJA, Craigon J. (1992). Evaluation of inert markers for the determination of ileal and fecal apparent digestibility values in the pig. British Journal of Nutrition, 68: 729-739.

Janssen, P. (2010). Influence of hydrogen on rumen methane formation and fermentation balances through microbial growth kinetics and fermentation thermodynamics. Animal Feed Science and Technology 160, 1–22.

Jiao HP, Dale AJ, Carson AF, Murray S, Gordon AW, Ferris CP. (2014). Effect of concentrate feed level on methane emissions from grazing dairy cows. Journal of Dairy Science 97, 7043–7053.

Johnson K, Johnson D. (1995). Methane emissions from cattle. Journal of Animal Science 73, 2483–2492.

Johnson K, Huyler M, Westberg H, Lambar B, Zimmerman P. (1994). Measurement of methane emissions from ruminant livestock using a SF₆ tracer technique. Environmental Science and Technology 28: 359-362.

Kamra D N. (2005). Rumen microbial ecosystem. Current Science; 89: 124-135.

Koch R, Swiger L, Chambers D, Gregory K. (1963). Efficiency of feed use in beef cattle. *J. Anim. Sci.* 22:486–494.

Krawielitzki K, Schadereit R, Borgmann E, Evers B. (1987). Cr₂O₃ and TiO₂ as markers for estimating passage rate and protein digestibility in rats. *Archives of Animal Nutrition*, 37: 1085-1099.

Latinga E, Neuteboom J, Meijs J. (2004). Sward Methods. In: P. Penning, *Herbage intake handbook* (2nd ed., pp. 23-52). Reading: The British Grassland Society.

Lee J, Woodward S, Waghorn G, Clark D. (2004). Methane emissions by dairy cows fed increasing proportions of white clover (*Trifolium repens*) in pasture. *Proceedings of the New Zealand Grassland Association* 66, 151–155.

Lovett D, Stack L, Lovell S, Callan J, Flynn B, Hawkins M, O'Mara F. (2005). Manipulating enteric methane emissions and animal performance of late-lactation dairy cows through concentrate supplementation at pasture. *Journal of Dairy Science* 88, 2836–2842.

Luton P, Wayne J, Sharp R, Riley P. (2002). The *mcrA* gene as an alternative to 16S rRNA in the phylogenetic analysis of methanogen populations in landfill. *Microbiology*. 148:3521–3530.

Makkar H, Vercoe P. (2007). *Measuring Methane Production from Ruminants*. Joint FAO/IAEA. Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture. International Atomic Energy Agency, Vienna, Austria. 135 pp.

Makkar H. (2003). *Quantification of tannins in tree and shrub foliage. A laboratory manual*. FAO/IAEA Publication, Rome, Italy.

Martin C, Morgavi D, Doreau M. (2010). Methane mitigation in ruminants: from microbe to the farm scale. *Anim* 4: 351-365.

McCaughy W, Wittenberg K, Corrigan D. (1999). Impact of pasture type on methane production by lactating beef cows. *Can J. Anim.Sci.* 79:221–226.

McDonald P, Edwards R, Greenhalgh J, Morgan C. (1995). *Animal Nutrition*. Singapore: Longman. 607 pp.

Mendoza M, Pinos J, Ricalde V, Aranda I, Rojo R. (2003). Simulation model to estimate the caloric balance of cattle grazing. *Intercien* 28, 202–207.

Mertens DR. (1994). Improving intake and performance of forage-based rations. Madison, WI: Agricultural Research Service, USDA. [en línea]. Consultado 8 Jun 2017. Disponible en: <http://www.txanc.org/docs/Improving-intake-and-performances-of-forage-based-rations.pdf>

MGAP. DIEA. (2017). Anuario Estadístico de DIEA. [en línea]. Consultado 1 Jul 2018. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/unidad-organizativa/oficina-de-programacion-y-politicas-agropecuarias/publicaciones/anuarios-diea/anuario-estad%C3%ADstico-de-diea-2017>

MGAP. OPYPA. (2017). Análisis sectorial y Cadenas productivas. [en línea]. Consultado 7 Jul 2018. Disponible en: http://www.mgap.gub.uy/sites/default/files/anuario_opypa_2017.pdf

Mieres J, Assandri L, Cuneo M. (2004). Tablas de valor nutritivo de alimentos. In ‘Guía para la alimentación de rumiantes’. Serie Técnica N° 142. (Ed. JM Mieres) pp. 17–47 (INIA Ediciones: Uruguay).

Milford R, Minson D. (1966). Intake of tropical pastures species. International Grassland Congress. N°9, Sao Paulo, Brasil, 815-822.

Moorby J, Fleming H, Theobald V, Fraser M. (2015). Can live weight be used as a proxy for enteric methane emissions from pasture-fed sheep? Scientific Reports 5, 1-9.

Müller K, Lin L, Wang C, Glindemann T, Schiborra A, Schonbach P, Wan H, Dickhoefer U, Susenbeth A. (2012). Effect of continuous v. daytime grazing on feed intake and growth of sheep grazing in a semi-arid grassland steppe. Anim 6: 526–534.

Muñoz C, Hube S, Morales J, Yan T, Ungerfeld E. (2015). Effects of concentrate supplementation on methane emissions and milk production of grazing dairy cows. Livest. Sci. 175:37–46.

MVOTMA. (2016). INGEI. Cuarta Comunicación Nacional a la Conferencia de las partes en la Convención Marco de las Naciones Unidas sobre el Cambio Climático. [en línea]. Consultado 30 Jun 2018. Disponible en: <http://www.mvotma.gub.uy/portal/inventarios-nacionales/item/10001402-inventarios-nacionales.html>

Myers WD, Ludden PA, Nayigihugu V, Hess BW. (2006). Excretion of titanium dioxide and chromic oxide in duodenal digesta and feces of ewes. Small Ruminant Research, 63: 135-214.

- Myers K, Ludden P, Nayigihugu V, Hess B. (2004). A procedure for the preparation and quantitative analysis of samples for titanium dioxide. *J Anim Sci* 82: 179-183.
- Navajas E, Pravia M, Lema M, Clariget J, Aguilar I, Brito G, Peraza P, Dalla Rizza M, Montossi F. (2014). Genetic improvement of feed efficiency and carcass and meat quality of Hereford cattle by genomics. In: Proc. 60th Int. Congr. Meat Sci. Technol., ICoMST. p. 17–20.
- Nkrumah J, Okine E, Mathison G, Schmid K, Li C, Basarab J, Price M, Wang Z, Moore S. (2006). Relationships of feedlot feed efficiency, performance, and feeding behavior with metabolic rate, methane production, and energy partitioning in beef cattle. *J. Anim. Sci.* 84:145–153.
- NRC. (2016). ‘Nutrient requirements of beef cattle’. National Research Council, 8th Rev. Edn. (National Academies Press: Washington, DC) [en línea]. Consultado 18 Feb 2018. Disponible en: <https://www.nap.edu/download/19014>.
- NRC. (2001). ‘Nutrient requirements of dairy cattle. National Research Council, 7th Rev. Edn. (National Academies Press: Washington, DC).
- NRC. (2000). ‘Nutrient Requirements of Beef Cattle. 7th Rev. Edn. (National Academies Press: Washington, DC), 249 pp.
- Odongo N, Bagg R, Vessie G, Dick P, Hook S, Gray J, Kebreab E, France J, Mcbride B. (2007). Long-Term Effects of Feeding Monensin on Methane Production in Lactating Dairy Cows. *J. Dairy Sci.* 90:1781–1788.
- Ortiz D, Posada S, Noguera R. (2014). Efecto de metabolitos secundarios de las plantas sobre la emisión entérica de metano en rumiantes. *Livestock Research for Rural Development.* [en línea]. Consultado 14 Jul 2018. Disponible en: <http://www.lrrd.org/lrrd26/11/orti26211.html>
- Owens F, Hanson CF. (1992). External and internal markers for appraising site and extent of digestion in ruminants. *Journal Dairy Science*, 75: 2605-2617.
- Perdomo C, Irisarri P, Ernst O. (2009). Nitrous oxide emissions from an Uruguayan Argiudoll under different tillage and rotation treatments. *Nutr Cycl Agroecosyst* 84: 119-128.
- Pérez-Ruchel A, Repetto J, Cajarville C. (2013). Suitability of live yeast addition to alleviate the adverse effects due to the restriction of the time of access to feed in sheep fed only pasture. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl)*. 97:1043–1050.

Pickering N, Oddy V, Basarab J, Cammack K, Hayes B, Hegarty R, Lassen J, McEwan J, Miller S, Pinares-Patiño C, De Haas Y. (2015). Animal board invited review: Genetic possibilities to reduce enteric methane emissions from ruminants. *Animal* 9: 1431-1440.

Pinares-Patiño C, Gere J, Williams K, Gratton R, Juliarena P, Molano G, MacLean S, Sandoval E, Taylor G, Koolaard J. (2012). Extending the collection duration of breath samples for enteric methane emission estimation using the SF₆ tracer technique. *Animals (Basel)* 2, 275–287.

Pinares-Patiño C, Baumont R, Martin C. (2003). Methane emissions by Charolais cows grazing a monospecific pasture of timothy at four stages of maturity. *Canadian Journal of Animal Science* 83: 769-776.

Prigge E, Varga G, Vicini J, Reid R. (1981). Comparison of Ytterbium Chloride and Chromium Sesquioxide as Fecal Indicators. *J Anim Sci* 53, 1629–1633.

Ramírez JF, Posada Ochoa S, Noguera R. (2014). Metanogénesis ruminal y estrategias para su mitigación. *Rev CES Med Zootec* 9(2): 307-323.

Richardson E, Herd R. (2004). Biological basis for variation in residual feed intake in beef cattle. 2. Synthesis of results following divergent selection. *Aust. J. Exp. Agric.* 44:431–441.

Russell JB, Houlihan A. (2003). The ionophore resistance ruminal bacteria and its potential impact on human health. *FEMS Microbiol Rev.* 27:65–74.

Sampaio C, Detmann E, Valente T, Costa V, Valadares Filho S, Queiroz A. (2011). Fecal excretion patterns and short term bias of internal and external markers in a digestion assay with cattle. *R Bras de Zootec* 40: 657-665.

Santana A, Cajarville C, Mendoza A, Repetto JL. (2017). Combination of legume-based herbage and total mixed ration (TMR) maintains intake and nutrient utilization of TMR and improves nitrogen utilization of herbage in heifers. *Animal* 11: 616-624.

Savian J, Neto A, de David D, Bremm C, Schons R, Genro T, do Amaral G, Gere J, McManus C, Bayer C, de Faccio Carvalho P. (2014). Grazing intensity and stocking methods on animal production and methane emission by grazing sheep: Implications for integrated crop livestock system. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 190,112–119.

Shapiro S, Wilk M. (1965). An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika* 52, 591–611.

Short F, Gorton P, Wiseman J, Boorman K. (1996). Determination of titanium dioxide added as a marker in chicken digestibility studies. *Animal Feed Science Technology* 59, 2: 15-221.

Terry R, Tilley J. (1964). The digestibility of the leaves and stems of perennial ryegrass, cocksfoot, timothy, tall fescue, lucerne and sainfoin, as measured by an *in vitro* procedure. *Grass Forage Sci* 19, 363–372.

Tilley J, Terry R. (1963). A two-stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops. *J. Br. Grassl. Soc.* 18:104–111.

Titgemeyer E, Armendariz C, Bindel D, Greenwood R, Löest C. (2001). Evaluation of titanium dioxide as a digestibility marker for cattle. *J Anim Sci* 79: 1059-1063.

Trujillo AI, Casal A, Peñagaricano F, Carriquiry M, Chilibroste P. (2013). Association of SNP of neuropeptide Y, leptin, and IGF-1 genes with residual feed intake in confinement and under grazing condition in Angus cattle. *Journal Animal Science*, 91: 4235-4244.

Ungerfeld E, Rust S, Burnett R, Yokoyama M, Wang J. (2005). Effects of two lipids on *in vitro* ruminal methane production. *Anim Feed Sci Technol* 119(1): 179-185.

Van Soest P. (1994). *Nutritional Ecology of the Ruminant*, 2a ed., Ithaca, NY, USA, Cornell University Press, 475 p.

Van Soest P, Robertson J, Lewis B. (1991). Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J Dairy Sci* 74, 3583–3597.

Van Soest P. (1967). Development of a comprehensive system of feed analysis and its application to forages. *J Anim Sci* 26, 119–128.

Velazco J, Herd R, Cottle D, Hegarty R. (2017). Daily methane emissions and emission intensity of grazing beef cattle genetically divergent for residual feed intake. *Anim. Prod. Sci.* 57:627–635.

Vlaming J. (2008). Quantifying variation in estimated methane emission from ruminants using the SF₆ tracer technique. Thesis Doctoral. Palmerston North, New Zealand, Massey University. 186 pp.

Yáñez-Ruiz D, Macías B, Pinloche E, Newbold C. (2010). The persistence of bacterial and methanogenic archaeal communities residing in the rumen of young lambs. *FEMS Microbiol. Ecol.* 72:272–278.

11. ANEXOS

11.1. ANEXO I – PUBLICACIÓN I

Study of the variability of intake estimation in grazing conditions using Titanium Dioxide as external marker.

Dini Y^{1,*}, Ciganda V.S.², Cajarville C^{3<}

¹ Becaria Doctoral ANII.

² Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, Programa de Producción y Sustentabilidad Ambiental. Ruta 50 km 11, Estación Experimental La Estanzuela, Colonia.

³ Departamento de Nutrición Animal, Facultad de Veterinaria, UdelaR.

* Autor para correspondencia: yoanadini@gmail.com

Veterinaria (Montevideo) Volumen 54 DOI: <https://doi.org/10.29155/VET.23.208.1> Recibido: 01/08/2017
N° 208 (2017) 4-9 Aceptado: 25/11/2017

Resumen

Existen numerosas técnicas que permiten la estimación de la materia seca ingerida (MSI) por animales bajo condiciones de pastoreo. Sin embargo, el comportamiento selectivo del animal incorpora una importante fuente de variabilidad que afecta la confiabilidad de los resultados obtenidos. La técnica que utiliza dióxido de titanio (TiO₂) como marcador externo ha sido reportada como una alternativa confiable en la estimación del consumo. El objetivo de este estudio fue comparar la predicción de consumo empleando la técnica de TiO₂ en condiciones de pastoreo respecto a tres ecuaciones de predicción de consumo animal reportadas para situaciones similares a la experimental. Los datos utilizados correspondieron a un experimento realizado empleando 20 vaquillonas Hereford, agrupadas en dos lotes de 10 según su peso vivo (PV), en un diseño "crossover", realizado durante dos períodos: invierno y primavera 2013. En ambos períodos, cada lote fue asignado a dos pasturas de calidad inicial contrastante: 65,5% vs. 71,2% de digestibilidad de materia seca (DMS); 54,9% vs. 40,9% de fibra detergente neutro (FDN), y 11,6% vs 22,8 % de proteína cruda (PC). Cada período experimental consistió de 8 días de adaptación a la dieta y 5 días de medición con un suministro diario, desde el inicio, de 10 g de TiO₂ por animal. En cada período de medición se confeccionó una muestra compuesta de heces por animal a partir de su colecta diaria vía rectal y se determinó su composición química. Los resultados de MSI (kg d⁻¹) medidos para ambas pasturas utilizando la técnica de TiO₂ mostraron una mayor variabilidad que los resultados predichos por cualquiera de las tres ecuaciones. **Palabras clave:** consumo animal, marcador externo, dióxido de titanio, pastoreo.diferencial en porcinos con diarrea y enteropatía en Uruguay.

Summary

Many techniques have been developed for the estimation of dry matter intake (DMI) by animals under grazing conditions. However, the selective intake of pasture grass by cattle incorporates an important source of variability that affects the confidence of the obtained results. The technique based on the external marker titanium dioxide (TiO₂) has reported to be a reliable alternative in estimating animal intake. The objective of this study is to compare the TiO₂ technique under grazing conditions with respect to three animal intake prediction equations, which were developed under similar conditions of our experiment. The data analyzed correspond to a crossover experiment using 20 Hereford heifers, grouped into two lots of 10 according to their live weight (LW), and carried out during two periods: winter and spring 2013. In both periods, each lot was assigned to two pastures with contrasting initial quality: 65.5% vs. 71.2% dry matter digestibility (DMD); 54.9% vs. 40.9% neutral detergent fiber (NDF), and 11.6% vs. 22.8% crude protein (CP). Each experimental period consisted of 8 days of adaptation to the diet plus 5 days of measurements. From the beginning, 10 g of TiO₂ per animal were daily supplied. During each measurement period, a fecal composite sample per animal was elaborated from its daily collection per rectum, and its chemical composition was determined. The results of DMI (kg d⁻¹) measured for both pastures using the TiO₂ technique showed greater variability than the results predicted by any of the three equations.

Keywords: intake, external marker, titanium dioxide, grazing conditions.

Introducción

La determinación del consumo de materia seca (MSI) es imprescindible para conocer la cantidad de nutrientes disponibles para las funciones de mantenimiento, producción y preñez del animal (NRC, 2001). En condiciones de pastoreo, la medición directa de la ingesta de forraje de rumiantes no es simple de implementar ya que no se dispone de metodologías simples y precisas. Las estimaciones del consumo de forraje en forma indirecta con marcadores externos (suministrados por vía oral) o internos (empleando compuestos presentes en el alimento) son alternativas disponibles que permiten lograr resultados confiables. Según Owens y Hanson, 1992, un adecuado marcador no debe ser absorbido o afectado por el tracto digestivo, no debe influir en la fermentación ruminal, debe ser posible de detectarse a bajas concentraciones, debe ser inerte y no tóxico. Varios estudios han utilizado el dióxido de titanio (TiO_2) como marcador externo para la estimación de consumo en rumiantes en pastoreo (Glindemann y col., 2009; Müller y col., 2012; Sampaio y col., 2011). Esta técnica fue reportada originalmente por Short y col., 1996, en pollos, luego Titgemeyer y col., 2001, reportan el uso de TiO_2 en bovinos. De Souza y col., 2015, concluyen que el uso de TiO_2 como marcador externo es más preciso que el cromo (Cr_2O_3) por lo que recomiendan su utilización para la determinación de consumo en condiciones pastoriles. Asimismo, Titgemeyer y col., 2001, reportan que el uso de TiO_2 como marcador es una alternativa viable al uso del Cr_2O_3 , ya que se trata de un aditivo de la dieta animal totalmente inocuo sobre la salud humana. Por otra parte, el período para lograr el equilibrio entre el consumo y la excreción del TiO_2 es más breve respecto a la utilización de otros marcadores ya que serían suficientes 5 días luego de la administración inicial para lograr este equilibrio (Glindemann y col., 2009).

En Uruguay, las mediciones de consumo de forraje en condiciones pastoriles extensivas se han realizado utilizando principalmente la metodología de oferta y rechazo de forraje (Beretta y col., 2013). Si bien a partir de esta metodología se ha generado valiosa información para el país, la misma es cuestionada por Latinga y col., 2004, debido a imprecisiones vinculadas a factores como el tamaño, número y distribución de los puntos de muestreo así como la altura de corte y el tipo de pastura.

Los modelos o ecuaciones de predicción de la MSI en rumiantes son herramientas alternativas a la medición, ampliamente utilizadas en la práctica para estimar los requerimientos nutricionales y facilitar la presupuestación de la dieta animal. Sin embargo, la precisión de estas ecuaciones depende en gran medida de la inclusión en su algoritmo de factores del animal, de la dieta, del ambiente o del manejo que puedan afectar la MSI (Fuentes-Pila y col., 1996).

El objetivo de este estudio es evaluar el comportamiento de la técnica de TiO_2 para la medición del consumo de la MSI respecto a tres ecuaciones de predicción, y cuantificar el efecto de la calidad de las pasturas sobre las determinaciones.

Materiales y métodos

Para este estudio se utilizaron los datos de un experimento realizado en la Estación Experimental de INIA La Estanzuela, Colonia (Uruguay), durante el invierno y la primavera del año 2013. Todos los procedimientos que implican animales fueron aprobados por el Comité de Bioética del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA-Uruguay).

Diseño Experimental, Animales, Tratamientos y Manejo

Se emplearon 20 vaquillonas Hereford de 24 meses de edad promedio y se utilizó un diseño experimental cruzado incluyendo dos tipos de pastura y dos períodos experimentales de 13 días: ocho días de adaptación a la dieta y cinco días de medición. Los animales estuvieron permanentemente bajo condiciones de pastoreo y fueron agrupados en función del peso vivo (PV) inicial y asignados aleatoriamente ($n=10$) a cada tipo de pastura. El peso promedio de cada lote al inicio del período de mediciones fue de: $393,05 \pm 27,53$ y $397,65 \pm 26,47$ kg.

Los animales pastorearon dos pasturas de calidad contrastante: una pastura de alta calidad (pastura implantada, PI) compuesta principalmente por Cebadilla (*Bromus catharticus*) y Trébol rojo (*Trifolium pratense*); y otra de baja calidad (campo natural degradado, CND) con predominancia de gramilla (*Cynodon dactylon*) y *Paspalum* sp. El pastoreo fue realizado en franjas diarias, con una asignación inicial del 5% del PV a fin de no restringir el consumo en pastoreo. La disponibilidad inicial de forraje (medido por encima de 5 cm) se determinó en cada franja diaria mediante corte manual diario de la pastura en tres puntos elegidos al azar utilizando cuadros de $0,2$ m². Las mediciones para los dos tipos de pastura se realizaron en dos momentos del año: invierno y primavera. Dentro de cada estación, se realizaron dos períodos experimentales cruzando los animales alternando las pasturas. Los datos de composición química obtenidos en dichos experimentos se presentan en el cuadro I.

Cuadro I. Composición química de las pasturas según estación del año.

	Invierno		Primavera	
	CND ¹	PI ²	CND ¹	PI ²
Disponibilidad	4149±127,87	2625,98±195,5	3215±187,50	2430,45±138,52
MS %	48,24±3,73	19,57±0,86	27,92±1,17	18,32±0,48
PC %	9,41±0,27	21,14±0,51	11,55±0,23	22,81±0,35
FDN %	70,42±0,36	42,43±0,79	54,93±1,54	40,92±0,94
FDA %	33,90±0,30	27,42±0,79	30,30±0,88	26,77±0,86
DMS %	35,05±0,55	63,27±0,62	65,52±1,06	71,18±0,14

Disponibilidad= forraje ofrecido (kg MS/ha); MS= materia seca; PC= proteína cruda; FDN= fibra detergente neutro; FDA= fibra detergente ácido; DMS= digestibilidad de la materia seca. Área Asignada: 1= 0,07 ha, 2= 0,15 ha. Los datos presentados aquí son promedio por período. Los valores son medias y desviaciones estándar.

Para la determinación de la composición química de las muestras de forraje las mismas se pesaron en fresco y se llevaron a estufa a 60 °C durante 48 horas. La materia seca (MS) y la proteína cruda (PC=N*6,25) se analizaron de acuerdo con AOAC, 1990, métodos ID 934.01 e ID 955.04. La fibra detergente neutro (FDN) fue analizada con amilasa estable al calor y sulfito sódico y la fibra detergente ácido (FDA) fue determinada de acuerdo a Van Soest y col., 1991. La digestibilidad in vitro (DMS) fue determinada de acuerdo con Terry y Tilley, 1964.

Determinación de la materia seca ingerida

En cada experimento la MSI (kg d⁻¹) fue determinada utilizando la técnica del TiO₂ como marcador externo (Short y col., 1996). El TiO₂ fue suministrado diariamente a razón de 10 g/animal. Dadas las condiciones extensivas en las que se realizó el trabajo, esta dosis se suministró una vez al día durante la mañana, siempre en el mismo horario, de acuerdo con Titgemeyer y col., 2001. Para asegurar una adecuada recuperación del marcador en heces y lograr la estabilización ruminal del TiO₂ (Glinemann y col., 2009) los animales realizaron un período de acostumbramiento de ocho días durante el cual se les suministró el TiO₂ en la forma descrita anteriormente. La dosificación se realizó utilizando cápsulas de gelatina de cerdo (Torpac®, Miami, USA) las cuales fueron suministradas a los animales a través de un lanza-bolo comercial. Durante el período de mediciones se colectaron diariamente las heces de cada animal vía rectal, una vez al día durante la mañana. Las mismas fueron pesadas individualmente y se llevaron a estufa a 60°C durante 48 horas para la determinación del contenido de MS. A partir de las colectas diarias, se obtuvo una muestra compuesta por animal en cada período de medición, confeccionada utilizando 2 g del total de sus heces colectadas diariamente que se mezclaron y molieron utilizando un tamiz con malla de 1 mm. La concentración de TiO₂ en heces se analizó utilizando el procedimiento descrito por Myers y col., 2004. Para ello se tomó una submuestra de heces de cada muestra compuesta por animal. La submuestra fue pesada y su materia orgánica extraída en horno de mufla durante 13 horas a 580 °C la que posteriormente fue digerida utilizando H₂SO₄ 7,4 M. Con un previo filtrado y dilución la muestra se llevó a un espectrofotómetro (Thermo, GENESYS 10S UV-Vis, USA) donde se realizó la lectura colorimétrica a 410 nm. Al mismo tiempo se elaboró una escala a partir de una solución patrón de 300 ppm de Ti obteniendo un rango de 0 a 30 ppm de Ti, la cual permitió obtener los valores de Ti en heces y la posterior estimación de la MSI (kg d⁻¹).

La producción de MS fecal (kg d⁻¹) se calculó a partir de la dosis de TiO₂ y de la concentración de TiO₂ en las heces utilizando la ecuación 1, de acuerdo con Prigge y col., 1981.

$$MS \text{ fecal (kg d}^{-1}\text{)} = \text{dosis de TiO}_2 \text{ (mg d}^{-1}\text{)} / \text{concentración de TiO}_2 \text{ en heces (mg kg}^{-1}\text{)} \quad (1)$$

La MSI (kg d⁻¹) de cada animal se calculó a partir de los gramos de MS en heces excretadas y la digestibilidad (DMS) del alimento consumido (pastura o campo degradado en este caso) de

acuerdo a Corbett y Freer, 1995, ecuación 2:

$$MSI \text{ (kg d}^{-1}\text{)} = MS \text{ fecal (kg d}^{-1}\text{)} \times 100 / (100 - DMS) \quad (2)$$

Los datos de MSI, para invierno y primavera, obtenidos a partir de la estimación con TiO₂ fueron comparados con los valores obtenidos para cada animal y periodo de medición, a partir de tres metodologías de predicción seleccionadas. La primera metodología se basa en una ecuación del NRC, 2000, desarrollada para ganado de carne en crecimiento (ecuación 3, NRC-a) que utiliza el PV como única variable de predicción:

$$MSI \text{ (kg d}^{-1}\text{)} = 1,8545 + 0,01937 * \text{Peso Vivo inicial} \quad (3)$$

La metodología de Mertens, 1994, desarrollada para ganado de carne se basa en dos ecuaciones sucesivas (ecuaciones 4 y 5) y utiliza el PV animal y el contenido de FDN en la dieta:

$$FDNI \text{ (kg d}^{-1}\text{)} = 1,1 * (PV \text{ kg} / 100) \quad (4)$$

$$MSI \text{ (kg d}^{-1}\text{)} = FDNI \text{ (kg d}^{-1}\text{)} / FDN_{\text{dieta}} \text{ kg/kg MS} \quad (5)$$

Por último, se empleó una segunda ecuación del NRC, 2000, desarrollada para vaquillonas (ecuación 6, NRC-b) que utiliza además del PV animal, las concentraciones de PC y FDA de los forrajes:

$$MSI \text{ (kg d}^{-1}\text{)} = (0,002774 * PC \text{ (\%)} - 0,000864 * FDA) * PV^{0,75} \quad (6)$$

Análisis Estadísticos

Se realizaron estudios de regresión lineal simple entre los datos de MSI observados (TiO₂) y los predichos por las ecuaciones mencionadas, mediante PROC REG de SAS (versión 9.0; SAS Institute, Cary, NC, USA). Para las diferentes pasturas, los datos de consumo se compararon por ANOVA. Se aplicó el test de Dixon, 1951, para detección de outliers, empleando el criterio

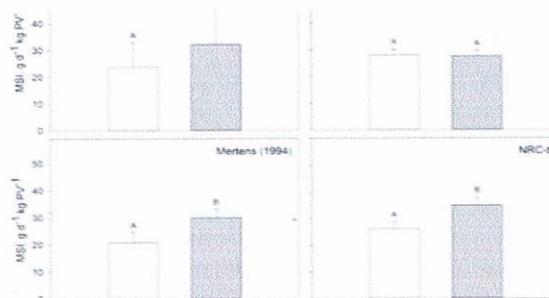


Figura 1. Relación entre la MSI observada (TiO₂) y predicha por NRC-a, por Mertens (1994) y por NRC-b para el conjunto total de datos (n=80).

de eliminación de los valores que superaran 3 desvíos estándar respecto a la media. Los resultados fueron considerados significativamente diferentes cuando P<0,05.

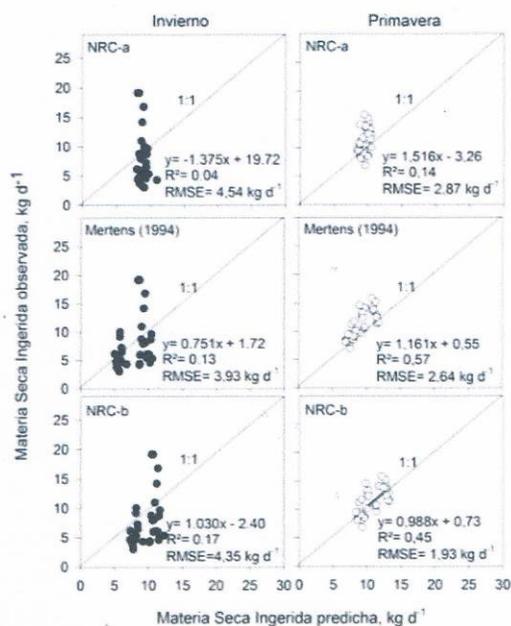


Figura 2. Relación entre la MSI observada (TiO_2) y predicha por las ecuaciones en invierno y en primavera. Las ecuaciones corresponden a NRC-a, Mertens (1994), y NRC-b.

Resultados

El análisis conjunto para los dos pasturas en invierno y primavera (Figura 1) mostró que las asociaciones entre la MSI observada con TiO_2 y las estimadas por Mertens, 1994 y NRC-b fueron mayores y con menores errores de predicción que la relación obtenida utilizando los valores predichos por NRC-a.

Al separar los datos por estación (Figura 2) se observa que las asociaciones entre la MSI observada (TiO_2) y las ecuaciones de predicción de consumo fueron mayores en primavera respecto al invierno, para todos los casos. Dentro de la primavera, la mayor relación entre los valores observados y los predichos se encontró utilizando la ecuación reportada por Mertens (1994) ($R^2=0,57$), mientras que el menor error de predicción se evidenció utilizando la NRC-b ($\text{RMSE}= 1,93 \text{ kg d}^{-1}$).

En cuanto a los valores absolutos observados con TiO_2 y los predichos, la utilización de las ecuaciones de Mertens (1994) y la NRC-b mostraron un mejor ajuste a la línea 1:1 respecto a la MSI predicha por la ecuación NRC-a. Como se desprende de las ecuaciones de regresión (Figuras 1 y 2), los valores absolutos obtenidos por la determinación con TiO_2 siempre fueron mayores a los predichos por cualquiera de las metodologías de predicción seleccionadas para este trabajo.

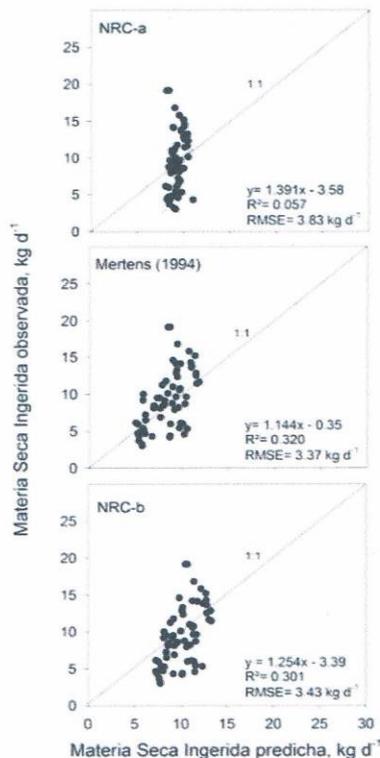


Figura 3. Variabilidad de la MSI medida por TiO_2 y predicha por NRC-a, por Mertens (1994) y por NRC-b, según tipo de pastura.

Los resultados obtenidos con la técnica de TiO_2 , tanto en CNP como en PI (Figura 3), muestran una mayor variabilidad entre todas las observaciones que los mismos resultados predichos por cualquiera de las tres metodologías utilizadas. La MSI media observada fue significativamente inferior en CNP que en PI ($23,72 \pm 9,32$ vs. $33,67 \pm 15,05 \text{ g MSI/kg PV}$, respectivamente). La MSI estimada con la ecuación NRC-a no mostró diferencias significativas entre tratamientos, con la misma variabilidad entre observaciones.

Discusión

El ajuste del conjunto global de datos entre los obtenidos con la técnica de TiO_2 y predichos fue en general bajo y extremadamente bajo cuando la metodología de predicción no incluye en su algoritmo ningún atributo de las pasturas, como es el caso de la metodología NRC-a. Los ajustes mejoraron con pasturas de calidad más alta, probablemente debido a que una mejor calidad de la pastura implicó una mayor proporción de PC, menor contenido de FDN y mayor DMS (Cuadro I), componentes de la dieta que tienen un efecto marcado sobre el consumo animal. Forbes, 2007, plantea que la ingesta inadecuada de proteínas llevaría a un menor consumo por interferencias con otros nutrientes. Además, es sabido que las dietas con muy bajo aporte

proteico causan una insuficiente multiplicación de la población microbiana que termina disminuyendo el consumo (Delagarde y col., 1999). Esto podría explicar los resultados de menor consumo animal observado en CND en invierno cuando los niveles de PC fueron más bajos (media= 9,41%) y cercanos a los límites inferiores que afectan el consumo (Milford y Minson, 1966). Por otro lado, tradicionalmente se ha vinculado el consumo de forraje en ruminantes con su contenido de FDN (Van Soest, 1967). Van Soest, 1994, reporta que existe un umbral de concentración de FDN en el forraje (aproximadamente 50%) por encima del cual se genera disconfort en el animal, deprimiendo el consumo por efecto de llenado. En el presente trabajo, en CND el alto contenido de FDN, principalmente en invierno (media=70,42%), puede haber generado un efecto de este tipo, que explicaría el menor consumo observado para dicho tratamiento. A su vez, la ecuación de predicción de Mertens, 1994, que toma en cuenta la FDN además del PV animal, fue la que mostró la mayor asociación con la medición directa, aunque puede considerarse regular ($R^2=0,57$) en primavera, con niveles medios de FDN de aproximadamente 50%. Sin embargo, la asociación fue inaceptable para los forrajes en invierno ($R^2=0,13$). Para este grupo de datos se detectaron un conjunto de 4 valores de consumo más altos que lo esperable para animales de esta categoría de acuerdo con la información existente (NRC, 2000). Estos representarían para animales individuales un 5,78; 5,63; 4,53 y 3,90 % del PV (Figuras 2 y 3). Se considera que estos valores no son razonables, sobre todo considerando la baja calidad de la pastura, por lo que podrían deberse a debilidades de esta técnica de medición de consumo en pasturas de baja calidad nutricional, aunque sería necesario realizar estudios específicos para confirmar este hecho. Hay que considerar además, el hecho de que en este trabajo se realizó una única colecta diaria, lo cual podría llevar a una mayor imprecisión de las medidas. En este sentido Sampaio y col., 2011, recomiendan trabajar con dos o más colectas diarias. Por otra parte, Forbes, 2007, plantea que existe una relación positiva entre la digestibilidad del forraje y el consumo, explicado en el hecho de que una mayor degradabilidad implica una mayor tasa de pasaje y por ende un mayor consumo. Nuestros resultados obtenidos con la técnica de TiO_2 globalmente coinciden con esta premisa, ya que el mayor consumo observado fue en PI en primavera ($MSI= 12,8 \text{ kg d}^{-1}$) con la mayor DMS (71,18%), mientras que el menor consumo correspondió a CND en invierno ($MSI=5,53 \text{ kg d}^{-1}$) con una DMS=35,05%.

La asociación entre la MSI obtenida con TiO_2 y la predicha utilizando NRC-a fue en todos los casos inaceptable ($R^2=0,06$). Si bien esta ecuación ha sido reportada específicamente para vacuillonas, las diferencias estarían explicadas en que la misma utiliza en su algoritmo únicamente el PV inicial y en que ha sido desarrollada para períodos experimentales de largo plazo, lo cual no coincide con el tiempo empleado para obtener los valores observados mediante la técnica de TiO_2 . La ecuación NRC-b, también reportada en NRC, 2000, incorpora aspectos de la composición química de las dietas como lo son la PC y FDA y mostró una asociación mayor entre la MSI obtenida con la técnica de TiO_2 ($R^2=0,30$), en relación a los obtenidos con la

ecuación NRC-a.

Una adecuada medición de la MSI es capaz de captar la variabilidad existente entre animales y entre dietas. Los resultados muestran que los valores obtenidos utilizando la técnica de TiO_2 presentaron una mayor variabilidad, respecto a las ecuaciones de predicción seleccionadas. Esto estaría explicado por las diferencias en el comportamiento animal individual el cual no es tenido en cuenta en los cálculos de las ecuaciones de predicción. Los coeficientes de variación obtenidos en la determinación de la MSI con TiO_2 en CND fueron de 37% y en PI de 45%. Dichos valores son superiores a la variabilidad reportada en trabajos nacionales en bovinos de similar categoría, en los cuales se midió el consumo en forma directa (oferta-rechazo) en comederos y que fueron cercanos al 10% (Félix y col., 2017; Santana y col., 2017). En los trabajos anteriormente citados, sin embargo, la digestibilidad de los alimentos empleados, tanto forrajes como dietas compuestas, tuvo en general digestibilidades más altas y homogéneas que las empleadas en este trabajo, lo cual podría explicar también la menor variabilidad en las ingestiones. De todas maneras, no es posible a partir de estos datos dilucidar si esta gran variabilidad no es en parte debida a la realización de una única colecta diaria.

Conclusiones

La medición de consumo utilizando TiO_2 en todos los casos estimó un mayor y más variable consumo de MS que los valores predichos por las tres ecuaciones seleccionadas. En general las asociaciones fueron mayores en forrajes de primavera y cuando las ecuaciones incluyeron variables de calidad de forraje. Teniendo en cuenta la alta variabilidad de los datos, sobre todo en pasturas de menor calidad, debería considerarse la doble dosificación y colecta diaria en futuros trabajos, considerando además las posibles interferencias de dicha dosificación sobre el comportamiento animal en pastoreo.

Agradecimientos

Se agradece al Dr. Cesar Pinares Patiño por su disposición frente a las frecuentes consultas realizadas, aportando su valiosa experiencia para realizar este estudio. Se agradece especialmente la participación de la Bach. Julieta Mariotta quien facilitó la realización de los trabajos de campo y laboratorio. Se agradece al Laboratorio de Suelos y Aguas de INIA La Estanzuela por la puesta a punto de la técnica para la determinación de TiO_2 .

Bibliografía

1. AOAC. (1990). Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemist, 15va ed., AOAC, Arlington, VA, USA.
2. Beretta V, Simeone A, Bentancur O. (2013). Manejo de la sombra asociado a la restricción del pastoreo: efecto sobre

- el comportamiento y performance estival de vacunos. *Agronomía* 17: 137-140.
3. Corbett J, Freer M. (1995). Ingestion et digestion chez les ruminants au pâturage. En: Jarrige R, Ruckebusch Y, Demarquilly C, Farce M, Journet M. (Eds.). *Nutrition des ruminants domestiques, ingestion et digestion*. Paris, France: INRA Editions, pp. 871-900.
 4. De Souza J, Batstel F, Welter K, Mendes Silva M, Fleury Costa D, Portela Santos F. (2015). Evaluation of external markers to estimate fecal excretion, intake, and digestibility in dairy cows. *Trop Anim Health Prod* 47:265-268.
 5. Delagarde R, Peyraud J, Delaby L. (1999). Influence of carbohydrate or protein supplementation on intake, behaviour and digestion in dairy cows strip-grazing low-nitrogen fertilized perennial ryegrass. *Anim* 48:81-96.
 6. Dixon W. (1951). Ratios involving extreme values. *J Ann Math Stat* 22: 68-78.
 7. Félix A, Repetto JL, Hernández N, Pérez-Ruchel A. (2017). Restricting the time of access to fresh forage reduces intake and energy balance but does not affect the digestive utilization of nutrients in beef heifers. *Anim Feed Sci Technol* 226:103-112.
 8. Forbes M. (2007). A personal view of how ruminant animals control their intake and choice of food: minimal total discomfort. *Nutr Res* 20: 132-146.
 9. Fuentes-Pila J, De Lorenzo M, Beede D, Staples C, Holter J. (1996). Evaluation of Equations Based on Animal Factors to Predict Intake of Lactating Holstein Cows. *J Dairy Sci* 79: 1562-1571.
 10. Glindemann T, Tas B, Wang C, Alvers S, Susenbeth A. (2009). Evaluation of titanium dioxide as an inert marker for estimating faecal excretion in grazing sheep. *Anim Feed Sci Technol* 152: 186-197.
 11. Latinga E, Neuteboom J, Meijs J. (2004). Sward Methods. En: Penning P (Ed.). *Herbage intake handbook*, The British Grassland Society, Reading, 2da ed., pp. 23-52.
 12. Mertens DR. (1994). Improving intake and performance of forage-based rations [en línea]. Madison, WI: Agricultural Research Service, USDA. Consultado 8 Jun 2017. Disponible en: <http://www.txanc.org/docs/Improving-intake-and-performances-of-forage-based-rations.pdf>
 13. Milford R, Minson D. (1966). Intake of tropical pastures species. *International Grassland Congress*. NO9, Sao Paulo, Brasil, 815-822.
 14. Müller K, Lin L, Wang C, Glindemann T, Schiborra A, Schonbach P, Wan H, Dickhoefer U, Susenbeth A. (2012). Effect of continuous v. daytime grazing on feed intake and growth of sheep grazing in a semi-arid grassland steppe. *Anim* 6:526-534.
 15. Myers K, Ludden P, Nayigihugu V, Hess B. (2004). A procedure for the preparation and quantitative analysis of samples for titanium dioxide. *J Anim Sci* 82: 179-183.
 16. NRC (2000). National Research Council. *Nutrient Requirements of Beef Cattle*, 7a ed., Washington DC, USA, National Academy Press, 249 p.
 17. NRC (2001). National Research Council. *Nutrient requirements of dairy cattle*, 7a ed., Washington DC, USA, National Academy Press, 401 p.
 18. Owens F, Hanson C. (1992). External and internal markers for appraising site and extent of digestion in ruminants. *J Dairy Sci* 75: 2605-2617.
 19. Prigge E, Varga G, Vicini J, Reid R. (1981). Comparison of Ytterbium Chloride and Chromium Sesquioxide as Fecal Indicators. *J Anim Sci* 53, 1629-1633.
 20. Sampaio C, Detmann E, Valente T, Costa V, Valadares Filho S, Queiroz A. (2011). Fecal excretion patterns and short term bias of internal and external markers in a digestion assay with cattle. *R Bras de Zootec* 40: 657-665.
 21. Santana A, Cajarville C, Mendoza A, Repetto JL. (2017). Combination of legume-based herbage and total mixed ration (TMR) maintains intake and nutrient utilization of TMR and improves nitrogen utilization of herbage in heifers. *Animal* 11: 616-624.
 22. Short F, Gorton P, Wiseman J, Boorman K. (1996). Determination of titanium dioxide added as an inert marker in chicken digestibility studies. *Anim Feed Sci Technol* 59: 215-221.
 23. Terry R, Tilley J. (1964). The digestibility of the leaves and stems of perennial ryegrass, cocksfoot, timothy, tall fescue, lucerne and sainfoin, as measured by an in vitro procedure. *Grass Forage Sci* 19, 363-372.
 24. Titgemeyer E, Armendariz C, Bindel D, Greenwood R, Löest C. (2001). Evaluation of titanium dioxide as a digestibility marker for cattle. *J Anim Sci* 79: 1059-1063.
 25. Van Soest P. (1967). Development of a comprehensive system of feed analysis and its application to forages. *J Anim Sci* 26, 119-128.
 26. Van Soest P, Robertson J, Lewis B. (1991). Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J Dairy Sci* 74, 3583-3597.
 27. Van Soest P. (1994). *Nutritional Ecology of the Ruminant*, 2a ed., Ithaca, NY, USA, Cornell University Press, 475 p.

11.2. ANEXO II – PUBLICACIÓN II

Using highly nutritious pastures to mitigate enteric methane emissions from cattle grazing systems in South America

Y. Dini^{A,B}, J. I. Gere^{C,D}, C. Cajarville^A and Verónica S. Ciganda^{E,F}

^ADepartamento de Nutrición Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Ruta 1 km 42.5, San José, Uruguay.

^BBecaria Doctoral ANII.

^CUIDI, Facultad Regional Buenos Aires, Universidad Tecnológica Nacional, Medrano 951. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

^DConsejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Godoy Cruz 2290, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

^EInstituto Nacional de Investigación Agropecuaria, Programa de Producción y Sustentabilidad Ambiental, Ruta 50 km 11, Estación Experimental La Estanzuela, Colonia, Uruguay.

^FCorresponding author. Email: vciganda@inia.org.uy

Abstract. Enteric methane (CH₄) emissions are directly related to the quantity and type of feed intake. Existing mitigation strategies, for example, the addition of legumes to grass-based diets and increased use of grains, have been thoroughly researched and applied in different production systems. In this paper, we propose a need to expand the capacity to mitigate enteric CH₄ emissions in cattle under grazing conditions. The objective of this paper was to contribute to evaluate a mitigation strategy under grazing conditions of using contrasting levels of pasture quality. The study was performed with 20 heifers twice during the year: winter and spring. Each season, the study employed a crossover design with two treatments and two 5-day measurement periods. The treatments were two pastures with different nutritional values, including a pasture with a low quality (70% of neutral detergent fibre, 1% of ether extract, 8% of non-fibre carbohydrates), 9% of crude protein, 35% of dry matter digestibility and a pasture with a high quality (42% neutral detergent fibre, 1.3% ether extract, 24% non-fibre carbohydrates, 21% crude protein and 63% dry matter digestibility). Enteric CH₄ emissions were measured with sulfur hexafluoride tracer technique. The dry matter intake (kg/day) was measured indirectly using titanium dioxide as an external marker. CH₄ emissions from animals grazing the high-quality pasture were 14% lower expressed as % of gross energy intake, and 11% lower expressed by unit of dry matter intake (g CH₄/kg). These results quantitative showed the alternative to mitigate CH₄ emissions from grazing bovines exclusively through the improvement of the forage quality offered.

Additional keywords: grazing conditions, pasture quality, SF₆ tracer technique.

Received 9 December 2016, accepted 3 August 2017, published online 23 November 2017

Introduction

After the 'Paris Climate Agreement', completed in December 2015, countries have pledged for periodically submitting their emission reduction commitments and plans for adaptation to climate change (Rogelj *et al.* 2016). In countries in which agricultural production is mainly based on pasture grazing systems, the emissions of methane (CH₄) produced by ruminal fermentation strongly contribute to the total greenhouse gases (GHG) emissions. The main source of CH₄ emission comes from enteric fermentation of the feed consumed by ruminants (McCaughey *et al.* 1999; Ramírez-Restrepo *et al.* 2016). So the knowledge of feeding management on pasture becomes an important topic for these countries.

The amount and type of feed intake affect the fermentation processes in the rumen. In absolute terms, CH₄ emissions are directly determined by the intake level, i.e. the higher the dry

matter intake (DMI) is, the greater the net emission will be (g/day) (Moorby *et al.* 2015). However, there are precedents that have affirmed the effects of diet quality on the production of CH₄ per unit of feed intake (Johnson and Johnson 1995; Velazco *et al.* 2017). The effect of including grains in the diet on reducing methanogenesis is known (Lovett *et al.* 2005), but this is not an effective strategy when there is a high allocation of high-quality forage material (Muñoz *et al.* 2015). Meanwhile, the incorporation of high nutritional quality pasture forages leads to lower emissions of CH₄ per unit of DMI (CH₄/kg DMI) compared with low-quality pure pastures (McCaughey *et al.* 1999; Lee *et al.* 2004; Hammond *et al.* 2011). Low-quality pastures increase ruminal methanogenesis because they provide higher levels of fibre that stimulate rumination and generate a lower passage rate of intake by the rumen as well as a higher rate of fermentation with higher levels of acetic and

hydrogen (Hammond *et al.* 2011). However, these results come from studies that investigated non-grazing and/or respiration chambers conditions, in which complex variables, such as selective grazing or the feed rate did not interfere with the results. Under pure grazing conditions, there are few precedents to evaluate the effects of incorporating high nutritional quality pastures on enteric CH₄ emissions. Therefore, there is a need for further studies to evaluate this mitigation strategy. The aim of this study was to quantify CH₄ emissions from cattle under grazing conditions with contrasting levels of pasture intake quality. This objective was based on the assumption that grazing from a high-quality pasture can decrease the production of CH₄ per unit of DMI compared with grazing from low-quality forage.

Materials and methods

The study was completed at the Experimental Station INIA La Estanzuela (Colonia, Uruguay, GPS Coordinates: S Latitude 34°20.727', W length 57°42.665') between June and October 2013. All procedures involving animals were approved by the Bioethics Committee at the National Institute for Agricultural Research (INIA-Uruguay).

Experimental design, animals, pastures and management

The study was conducted with 20 Hereford heifers at two times during the year, winter (11 June–7 July) and spring (22 September–18 October), using a statistical experimental crossover design that included two treatments and two 5-day measurement periods. Treatments consisted of animals grazing pastures with two divergent qualities, including a pasture with low nutritional value and a pasture with high nutritional value. The nutritional values were defined depending on crude protein (CP), neutral detergent fibre (NDF) concentration and *in vitro* digestibility. The chemical composition and *in vitro* digestibility of the two pastures is presented in Table 1.

The winter botanical composition in pasture with low nutritional value was characterised by a predominance of

Cynodon dactylon (more than 60%) in an advanced growth stage, *Lolium multiflorum*, *Paspalum dilatatum* and minimum quantities of *Trifolium repens* (less than 10%). In spring, the pasture with low nutritional value showed a higher prevalence of *Lolium multiflorum* than in winter (representing near 60% of the species) with the presence of low quantities of *Cynodon dactylon*, *Paspalum dilatatum* and *Trifolium repens*. In the pasture with high nutritional value, there was a predominance of legumes. In winter and spring, botanical composition of pasture with high nutritional value was characterised by a predominance of *Trifolium pratense* (near 50%); the other 50% was composed by *Bromus auleticus* and minimum quantities of *Trifolium repens*.

A group of 20 heifers of 24 months of age was selected for the experiment. Each treatment was randomly assigned to a group of 10 heifers blocked according to liveweight (LW). The LW of the animals was recorded at the beginning and at the end of each measurement period. The treatments were randomly assigned after blocking the groups for initial liveweight. The average LWs were 363.09 ± 26.76 kg in winter and 401.51 ± 30.39 kg in spring. Both groups of heifers grazed the assigned pastures for a period of 13 days (8 days of adaptation according to Pinares-Patiño *et al.* (2003), plus a sampling period of 5 days), and then the treatments were crossed.

Grazing was carried out on daily strips with an initial allocation of 5% of LW so that forage availability was not restricting intake and permitted *ad libitum* pasture intake. The initial availability of forage (>5 cm) was determined daily in each strip by cutting three random points using 0.2-m² tables.

Determination of CH₄ emissions

The determination of enteric CH₄ emissions was performed using sulfur hexafluoride (SF₆) tracer technique (Johnson *et al.* 1994) adapted by Gere and Gratton (2010). Eight days before the beginning of the measurements, each animal was given an oral permeation tube filled with SF₆ using a plastic dosing

Table 1. Forage mass, chemical composition and *in vitro* digestibility of the pastures used in the study
Available forage (kg DM/ha) = forage offered; DM = dry matter; CP = crude protein; ADF = acid detergent fibre; NDF = neutral detergent fibre; A = ash; ADL = acid detergent lignin; OM = organic matter; EE = ether extract; NFC = non-fibre carbohydrates (NFC = 100 – (CP + A + NDF + EE)); DMD = dry matter digestibility; OMD = organic matter digestibility. The data presented here are average per period. Values are means and standard deviations

	Low-quality pasture		High-quality pasture	
	Winter ^A	Spring ^B	Winter ^C	Spring ^D
Available forage	4149 ± 127.9	3215 ± 187.6	2625 ± 195.5	2430 ± 138.5
DM (%)	48.2 ± 3.73	27.9 ± 1.17	19.6 ± 0.86	18.3 ± 0.48
CP (%)	9.41 ± 0.27	11.6 ± 0.23	21.1 ± 0.51	22.8 ± 0.35
ADF (%)	33.9 ± 0.30	30.3 ± 0.88	27.4 ± 0.79	26.8 ± 0.86
NDF (%)	70.4 ± 0.36	54.9 ± 1.54	42.4 ± 0.79	40.9 ± 0.94
A (%)	10.9 ± 0.28	11.4 ± 0.15	11.2 ± 0.29	9.82 ± 0.15
ADL (%)	8.37 ± 0.26	6.70 ± 0.69	9.08 ± 0.37	8.11 ± 0.42
OM (%)	89.0 ± 0.28	88.6 ± 0.15	88.8 ± 0.29	90.2 ± 0.15
EE (%)	0.99 ± 0.16	1.58 ± 0.13	1.30 ± 0.23	2.06 ± 0.13
NFC (%)	8.23 ± 0.35	20.5 ± 1.63	24.3 ± 0.85	24.4 ± 1.16
DMD (%)	35.1 ± 0.55	65.5 ± 1.06	63.3 ± 0.62	71.2 ± 0.14
OMD (%)	31.1 ± 0.47	56.8 ± 0.95	56.0 ± 0.59	64.0 ± 0.17

^{A,B}Area assigned = 0.07 ha.

^{C,D}Area assigned = 0.15 ha.

applicator, and the tube was used as a marker for gas emissions. Immediately after, the animals were assigned to treatments and began the adaptation period for the pasture. Permeation rates (PR) of SF₆ from the tubes were an average of 6.65 mg/day (± 1.08) and 6.59 mg/day (± 1.08) in winter and spring, respectively. The collection of exhaled and burped gas was performed using two 0.5-L stainless steel containers per animal. These containers were evacuated and used as gas collectors coupled to a muzzle and placed on each side of the head. Following the procedure performed by other authors (Dini *et al.* 2012; Pinares-Patiño *et al.* 2012; Savian *et al.* 2014; Amaral *et al.* 2016), the containers remained on the animal for 5 days. At the end of each period, the containers were removed from the animals and post-sampling pressure was measured. Containers with pressure values of 400–600 mb were considered valid according to Gere and Gratton (2010) and Gere (2012) and ensures good quality samples. Containers with pressure values <400 mb were removed from the experiment. Five sub-samples were extracted from each container and stored in 12-mL vacutainers for determining CH₄ and SF₆ concentrations. Subsequently, the containers were emptied, cleaned with N₂, evacuated, and placed on the animals assigned for the crossed treatment for a second 5-day period of gas collection.

Determination of dry matter intake

The DMI (kg/day) of the animals was measured indirectly using titanium dioxide (TiO₂) as an external marker according to the technique described by Short *et al.* (1996). Briefly, every morning animals were taken to a barnyard, where they were given a gelatin capsule containing 10 g of TiO₂ (14.5 g, 69% purity). To achieve a ruminal steady-state, the capsule regimen was initiated 8 days before the beginning of the sampling period (Glindemann *et al.* 2009). Immediately after de TiO₂ supply, a faecal sample was collected via rectus from each heifer. All this manipulation was performed in 30 min. Upon arrival at the laboratory, individual faecal samples were weighed, dried at 60°C for 96 h and ground to pass through a 1-mm screen. Two grams from each single sample were taken during the 5 days of measurements to form a composite faecal sample for each animal. Composite samples were analysed for NDF, acid detergent fibre (ADF), ash and acid detergent lignin (ADL). In addition, the TiO₂ concentration was determined using a procedure described by Short *et al.* (1996).

The mean daily DMI (kg/day) per animal was calculated using the faecal DM output (kg/day) and the DMD of herbage (DMD %) according to Corbett and Freer (1995) (Eqn 1):

$$\text{DMI (kg/day)} = \frac{\text{Faecal DM output (kg/day)} \times 100}{(100 - \text{DMD})} \quad (1)$$

The mean daily faecal DM output was calculated from the daily TiO₂ dose and the TiO₂ concentration in the faeces of individual animals according to the method of Prigge *et al.* (1981) (Eqn 2):

$$\text{Faecal DM output (kg/day)} = \frac{\text{TiO}_2 \text{ dose (mg/day)}}{\text{TiO}_2 \text{ in faeces (mg/kg DM)}} \quad (2)$$

Calculation of gain or loss weight from intake

Daily weight gain was estimated for each heifer and period using the NRC (2016) program, based on individual intake, forage quality, age, the average liveweight per heifer and period, and other characteristics of the experimental animals (i.e. breed, sex). For animals losing weight (i.e. daily weight gain resulted in a negative value), the weight was estimated using the following equation (Eqn 3) (Davis *et al.* 1994).

$$\text{MEg} = \text{D1} \times \text{LW}^{0.75} \times \text{ADWT}^{1.119} / \text{kg} \quad (3)$$

where MEg is the metabolisable energy (ME) requirement for gain. Values for D1 were based on frame size (in the case of Hereford, the value is 0.0686), according to Davis *et al.* (1994). LW^{0.75} is the metabolic weight, ADWT is the average daily weight change between each weigh period (i.e. ADG), kg is the efficiency of ME use for gain, calculated as proposed by the author. Direct LW measurements were not used to estimate weight changes because they were very little spaced (5 days).

The CH₄ emission intensity (g CH₄/kg LW) was calculated for each heifer based on the data on daily CH₄ emission and daily weight gain derived from NRC (2016) program.

Chemical analyses

Forage samples were weighed and dried at 60°C for 48 h. They were ground to pass a 1-mm screen and analysed to determine their chemical composition. Dry matter, ash and total nitrogen contents were analysed according to AOAC (1990; methods ID 934.01, ID 942.05 and ID 955.04, respectively). The NDF was analysed with heat-stable amylase and sodium sulfite. ADF and ADL were determined using the methods of Van Soest *et al.* (1991), including residual ash. The ether extract fraction was determined by extracting the fat with petroleum ether for 4 h using a Goldfish fat extractor (Labconco Corp., Kansas City, MO, USA). Organic matter was determined as (100 - %ash). The *in vitro* digestibility of forage was determined according to Terry and Tilley (1964) and gross energy was determined with an adiabatic bomb calorimeter (Autobomb Gallenkamp; Loughborough, Leicester, United Kingdom).

The TiO₂ concentration in faeces was determined using the procedure described by Short *et al.* (1996) with a spectrophotometer (Thermo, model Genesys 10 μ V, INIA La Estanzuela, Colonia, Uruguay).

A gas chromatograph (Perkin Elmer Clarus 600, INTA Castelar, Hurlingham, Argentina) with a flame ionisation detector and an electron capture detector was used for determining CH₄ and SF₆, respectively. After obtaining a chromatographic analysis of samples, the emissions of CH₄ per animal were calculated using the PR of each SF₆ capsule and the concentrations of CH₄ and SF₆ (Eqn 4).

$$\text{CH}_4 \text{ (g/day)} = \text{PR SF}_6 \text{ (g/day)} \times [\text{CH}_4] / [\text{SF}_6] \quad (4)$$

where PR SF₆ is the permeation rate of the SF₆ capsule, [CH₄] and [SF₆] are the concentrations of the gases (in ppm and ppt, respectively) above atmospheric concentrations.

Statistical analyses

Data for intake, LW, daily gain, CH₄ emissions and emission intensity were analysed using the MIXED procedure in SAS

(version 9.0; SAS Institute, Cary, NC, USA), according to the following model (Eqn 5):

$$Y_{ijklm} = \mu + T_i + E_j + P(E)_{jk} + A_l + (T \times E)_{ij} + e_{ijklm} \quad (5)$$

where Y_{ijklm} is the dependent variable, μ is the general mean, T_i the fixed effect of the treatment (i = pasture low and high nutritional value), E_j is the fixed effect of season (j = winter and spring), $P(E)_{jk}$ is the effect of k level of period nested within j level of season ($k = 1-4$), A_l is the animal effect (analysed as random effect; $l = 1-20$), $(T \times E)_{ij}$ is the interaction between treatment and season and e_{ijklm} is the residual error.

Means were compared with a Tukey-Kramer test. Normality test was applied to all variables (Shapiro and Wilk 1965), the only one that showed a different distribution was CH_4 so a logarithmic transformation (Log_{10}) was performed to normalise it. These normalised data were analysed with PROC MIXED as described above. The results were considered significantly different when $P < 0.05$, and a trend was confirmed when $P < 0.10$.

Results

Daily DMI (kg/day), in absolute terms and also when expressed in relation to LW (%LW), metabolic weight (%LW^{0.75}), daily intake of CP (CPI, kg/day) and daily intake of gross energy (GEI, Mcal/day) were significantly higher in high-quality pastures ($P < 0.05$), whereas no differences were found for NDF intake between treatments ($P > 0.10$; Table 2). Significant differences were found between seasons for daily DMI, CPI, GEI and NDFI ($P < 0.05$) whereas the treatment-season interaction was not significant ($P > 0.10$).

The emission of CH_4 expressed as a percentage of the GEI (Ym) was higher in animals grazing on a low-quality pasture

($P < 0.05$). Additionally, emissions expressed per unit of DMI tended to be higher in the low-quality pasture than in the high-quality pasture ($P = 0.055$; Table 3). No differences between treatments or between seasons were evident in the emissions of CH_4 expressed by unit intake of organic matter, NDF or ADF ($P > 0.10$; Table 3).

Animals grazing the low-quality pasture showed an estimated daily weight gain of 0.27 kg/day and 0.41 kg/day in winter and in spring, respectively. Such results allowed to calculate an emission intensity of 404 and 399 g CH_4 /kg LW (13.75 vs 13.56 kg CO_2 -eq), respectively. However, animals grazing the high-quality pasture gained 0.80 kg/day and 1.4 kg/day in winter and in spring, respectively, with emissions intensity of 200 and 126 g CH_4 /kg LW (6.81 vs 4.30 kg CO_2 -eq), respectively.

Discussion

This study cannot differentiate if botanical composition affected the results. Moreover, it is possible that other factors (e.g. presence of secondary compounds) not described in this paper may have affected DMI and CH_4 emissions. Even considering that fact, the greater DMI observed in animals grazing on the high-quality pasture can be explained by the lower content of NDF and higher content of CP associated with higher digestibility. In addition, animals grazing the low-quality pasture showed a relatively low intake of ~2% LW, whereas animals in the high-quality pasture showed an intake close to 3% LW. These results would explain the higher emissions in absolute terms (g/day) that were observed for the high-quality pasture treatment. There were no differences in NDFI indicating that intake was limited by the concentration of NDF in the forage, which was similar to the maximal NDF estimated

Table 2. Effects of pasture quality (treatment) and season on intake of nutrients

DMI = dry matter intake (kg/day); OMI = organic matter intake (kg/day); NDFI = neutral detergent fibre intake (kg/day); ADFI = acid detergent fibre intake (kg/day); CPI = crude protein intake (kg/day); GEI = gross energy intake (Mcal/day); GEI/kg LW = gross energy intake per kilogram liveweight (Mcal/kg); GEI/kg LW^{0.75} = gross energy intake per kilogram of metabolic weight (Mcal/kg); DMI %LW = dry matter intake as a percentage of liveweight (%); DMI %LW^{0.75} = dry matter intake as a percentage of metabolic weight (%); OMI %LW = organic matter intake as a percentage of liveweight (%); OMI %LW^{0.75} = organic matter intake as a percentage of metabolic weight (%); NDFI %LW = neutral detergent fibre intake as a percentage of liveweight (%); NDFI %LW^{0.75} = neutral detergent fibre intake as a percentage of metabolic weight (%); ADFI %LW = acid detergent fibre intake as a percentage of liveweight (%); ADFI %LW^{0.75} = acid detergent fibre intake as a percentage of metabolic weight (%). Values are least-squares means and standard errors

	Low-quality pasture		High-quality pasture		Treatment	Probability	
	Winter	Spring	Winter	Spring		Season	Treatment*Season
DMI	5.50 ± 0.49	10.1 ± 0.54	10.1 ± 1.40	12.8 ± 0.52	<0.0001	<0.0001	0.0959
OMI	4.10 ± 0.41	6.20 ± 0.23	6.50 ± 1.03	7.60 ± 0.31	0.0002	0.0016	0.1344
NDFI	3.90 ± 0.35	5.50 ± 0.24	4.30 ± 0.61	5.20 ± 0.22	0.524	0.0003	0.1459
ADFI	1.90 ± 0.16	3.00 ± 0.14	2.70 ± 0.34	3.40 ± 0.16	0.0021	<0.0001	0.1224
CPI	0.50 ± 0.05	1.20 ± 0.06	2.10 ± 0.29	2.90 ± 0.12	<0.0001	<0.0001	0.9074
GEI	22.0 ± 1.91	43.2 ± 2.20	40.9 ± 5.64	57.9 ± 2.40	<0.0001	<0.0001	0.2542
GEI/kg LW	0.10 ± 0.01	0.10 ± 0.004	0.10 ± 0.02	0.20 ± 0.01	<0.0001	<0.0001	0.1782
GEI/kg LW ^{0.75}	0.30 ± 0.02	0.50 ± 0.02	0.50 ± 0.07	0.70 ± 0.03	<0.0001	<0.0001	0.1936
DMI %LW	1.50 ± 0.13	2.50 ± 0.11	2.80 ± 0.41	3.20 ± 0.12	<0.0001	0.0013	0.0723
DMI %LW ^{0.75}	6.70 ± 0.58	11.2 ± 0.52	12.3 ± 1.76	14.3 ± 0.54	<0.0001	0.0004	0.0767
OMI %LW	1.10 ± 0.11	1.50 ± 0.05	1.80 ± 0.30	1.90 ± 0.07	0.0002	0.0537	0.1107
OMI %LW ^{0.75}	4.90 ± 0.48	6.90 ± 0.21	7.90 ± 1.29	8.50 ± 0.33	0.0002	0.026	0.1149
NDFI %LW	1.10 ± 0.09	1.40 ± 0.05	1.20 ± 0.18	1.30 ± 0.05	0.4208	0.0259	0.1561
NDFI %LW ^{0.75}	4.70 ± 0.41	6.10 ± 0.22	5.20 ± 0.77	5.90 ± 0.22	0.4388	0.0101	0.1537
ADFI %LW	0.50 ± 0.04	0.80 ± 0.03	0.70 ± 0.10	0.90 ± 0.04	0.0019	0.0025	0.1054
ADFI %LW ^{0.75}	2.20 ± 0.19	3.40 ± 0.13	3.30 ± 0.42	3.80 ± 0.16	0.0022	0.0008	0.1091

Table 3. Effects of pasture quality (treatment) and season on CH₄ emissions

Emissions = daily CH₄ emissions (g/day); Ym = methane yield (%); CH₄/kg DMI = CH₄ emission per kilogram of dry matter intake (g/kg); CH₄/kg OMI = CH₄ emission per kilogram of organic matter intake (g/kg); CH₄/kg NDFI = CH₄ emission per kilogram of neutral detergent fibre intake (g/kg); CH₄/kg ADFI = CH₄ emission per kilogram of acid detergent fibre (g/kg); CH₄/kg LW = intensity of emission

	Low-quality pasture		High-quality pasture		Treatment	Probability Season	Treatment × Season
	Winter	Spring	Winter	Spring			
Emissions	109 ± 7.10	164 ± 21.33	160 ± 10.84	177 ± 23.80	0.065	0.099	0.241
Emissions, log ₁₀	2.00 ± 0.03	2.20 ± 0.05	2.20 ± 0.03	2.20 ± 0.06	0.032	0.086	0.127
Ym	7.90 ± 1.07	5.20 ± 0.77	7.00 ± 1.44	4.20 ± 0.59	0.043	0.006	0.352
Ym, log ₁₀	0.90 ± 0.06	0.70 ± 0.06	0.80 ± 0.10	0.60 ± 0.07	0.031	0.019	0.398
CH ₄ /kg DMI	23.6 ± 3.19	16.8 ± 2.45	21.6 ± 4.89	14.3 ± 2.07	0.077	0.024	0.375
CH ₄ /kg DMI, log ₁₀	1.30 ± 0.06	1.20 ± 0.06	1.30 ± 0.10	1.10 ± 0.07	0.055	0.067	0.353
CH ₄ /kg OMI	33.4 ± 5.27	27.4 ± 4.38	36.7 ± 8.09	24.0 ± 3.55	0.289	0.082	0.799
CH ₄ /kg OMI, log ₁₀	1.50 ± 0.07	1.40 ± 0.05	1.50 ± 0.11	1.40 ± 0.07	0.184	0.204	0.629
CH ₄ /kg NDFI	33.5 ± 4.54	30.7 ± 4.64	51.6 ± 10.85	35.0 ± 5.10	0.244	0.141	0.687
CH ₄ /kg NDFI, log ₁₀	1.50 ± 0.06	1.50 ± 0.05	1.70 ± 0.10	1.50 ± 0.07	0.390	0.331	0.894
CH ₄ /kg ADFI	66.5 ± 9.89	55.6 ± 8.37	79.2 ± 13.79	53.2 ± 8.48	0.863	0.094	0.960
CH ₄ /kg ADFI, log ₁₀	1.80 ± 0.07	1.70 ± 0.05	1.90 ± 0.09	1.70 ± 0.07	0.806	0.210	0.940
CH ₄ /kg LW	404 ± 75.20	399 ± 122.15	200 ± 98.75	126 ± 15.18	0.010	0.715	0.117

based on LW (Mendoza *et al.* 2003). The higher DM intake in the high-quality pasture resulted in emissions of CH₄ (g/day) that were 24% higher than emissions from the low-quality treatment, which was consistent with the results of Moorby *et al.* (2015). Forage chemical components such as ether extract and NFC, in addition to NDF, CP and digestibility, may have also had a remarkable impact on CH₄ emission. In this work, high-quality pasture presented an ether extract content 30% higher than the low-quality both in winter and spring. NFC were more than 3-fold higher in winter and 30% higher in spring than for the low-quality pasture. The Ym values obtained were similar to the values reported in previous studies conducted under similar conditions but with dairy cows (Dini *et al.* 2012) and sheep grazing on ryegrass with different intensities and types of grazing (Savian *et al.* 2014). The emissions of CH₄ expressed per unit of intake (CH₄/kg DMI) or as percentage of the GEI (Ym) were 11% and 14% lower, respectively, in animals that grazed on the high-quality pasture compared with the low-quality pasture. Such emissions reduction obtained in this study through the use of high-quality pasture coincides with the reported range of reductions of 12–25% found in research studies but for non-grazing situations (McCaughy *et al.* 1999; Lee *et al.* 2004; Hammond *et al.* 2011). The high-quality pasture used in this work was similar to high-quality temperate pastures used under intensive grazing management by farmers in Uruguay (Mieres *et al.* 2004). There are several studies that highlight the incorporation of grains in animal diets as a strategy for reducing CH₄ emissions by unit of intake (Lovett *et al.* 2005; Jiao *et al.* 2014; Muñoz *et al.* 2015). However, in this study, we found that it was possible to reduce these emissions with grazing systems alone through improvement in the forage quality that was offered. These results were confirmed by those obtained for emissions intensity (g CH₄/kg LW), which showed that emissions intensity was four times lower in animals grazing high-quality pastures compared with animals grazing low-quality pastures. In addition, these results suggest that for meat production systems, the emission of CH₄ should be expressed per kg LW more than in absolute terms. Therefore, the potential use of

pasture quality as a strategy for mitigating the emissions of enteric CH₄ raises the need to emphasise and strengthen research to determine the extent to which emissions could be reduced through this alternative.

Conclusions

Enteric CH₄ emissions from grazing cattle were significantly lower in animals that grazed on the high-quality pasture, expressed either through unit of intake (DMI) or as percentage of the GEI (Ym). Therefore, it is possible to use the quality of pastures as a mitigation strategy for GHG emissions in grazing production systems. However, further studies are necessary to evaluate the effects of different forage mixtures on ruminal methanogenesis and to determine the limits of their mitigation potential.

Conflicts of interest

The authors declare no conflicts of interest.

Acknowledgements

This study was supported financially by the Fontagro Project FTG/RF 1028 RG. The authors thank Bach, Julieta Mariotta and Ing. Agr. Juan Manuel Clariget for their help and technical support. We gratefully acknowledge the Department of Nutrition and Cattle (IPAV, Facultad de Veterinaria), the Nutrition Laboratory and the Soils and Water Laboratory (INIA la Estanzuela) for data processing. We also thank Dr César Pinares-Patiño for his valuable advice.

References

- Amaral GA, David DB, Gere JI, Savian JV, Kohmann MM, Nadin LB, Sánchez Chopa F, Bayer C, Carvalho PC (2016) Methane emissions from sheep grazing pearl millet (*Penisetum americanum* (L.) Leake) swards fertilized with increasing nitrogen levels. *Small Ruminant Research* 141, 118–123. doi:10.1016/j.smallrumres.2016.07.011
- AOAC (1990) 'Official methods of analysis.' 15th edn. (Association of Official Analytical Chemists: Arlington, VA)
- Corbett JL, Freer M (1995) Ingestion et digestion chez les ruminants au pâturage. In 'Nutrition des ruminants domestiques, ingestion et digestion'.

- (Eds R Jarrige, Y Ruckebusch, C Demarquilly, MH Farce, M Journet) pp. 871–900. (INRA Editions: Paris, France)
- Davis KC, Tess MW, Kress DD, Doornbos DE, Anderson DC (1994) Life cycle evaluation of five biological types of beef cattle in a cow-calf range production system: I. Model development. *Journal of Animal Science* **72**, 2585–2590. doi:10.2527/1994.72102585x
- Dini Y, Gere J, Briano C, Manetti M, Juliarena P, Picasso V, Gratton R, Astigarraga L (2012) Methane emission and milk production of dairy cows grazing pastures rich in legumes or rich in grasses in Uruguay. *Animals (Basel)* **2**, 288–300. doi:10.3390/ani2020288
- Gere JI (2012) La técnica de trazado por SF₆ para medir emisiones de metano de rumiantes en pastoreo: Desarrollos metodológicos y algunas aplicaciones. PhD Thesis, Faculty of Exact Sciences, Tandil, Argentina.
- Gere JI, Gratton R (2010) Simple, low-cost flow controllers for time averaged atmospheric sampling and other applications. *Latin American Applied Research* **40**, 377–381.
- Glindemann T, Tas BM, Wang C, Alvers S, Susenbeth A (2009) Evaluation of titanium dioxide as an inert marker for estimating faecal excretion in grazing sheep. *Animal Feed Science and Technology* **152**, 186–197. doi:10.1016/j.anifeedsci.2009.04.010
- Hammond KJ, Hoskin SO, Burke JL, Waghorn GC, Koolgaard JP, Muetzel S (2011) Effects of feeding fresh white clover (*Trifolium repens*) or perennial ryegrass (*Lolium perenne*) on enteric methane emissions from sheep. *Animal Feed Science and Technology* **166–167**, 398–404. doi:10.1016/j.anifeedsci.2011.04.028
- Jiao HP, Dale AJ, Carson AF, Murray S, Gordon AW, Ferris CP (2014) Effect of concentrate feed level on methane emissions from grazing dairy cows. *Journal of Dairy Science* **97**, 7043–7053. doi:10.3168/jds.2014-7979
- Johnson KA, Johnson DE (1995) Methane emissions from cattle. *Journal of Animal Science* **73**, 2483–2492. doi:10.2527/1995.7382483x
- Johnson K, Huyler M, Westberg H, Lamb B, Zimmerman P (1994) Measurement of methane emissions from ruminant livestock using a sulfur hexafluoride tracer technique. *Environmental Science & Technology* **28**, 359–362. doi:10.1021/es00051a025
- Lee JM, Woodward SL, Waghorn GC, Clark DA (2004) Methane emissions by dairy cows fed increasing proportions of white clover (*Trifolium repens*) in pasture. *Proceedings of the New Zealand Grassland Association* **66**, 151–155.
- Lovett DK, Stack LJ, Lovell S, Callan J, Flynn B, Hawkins M, O'Mara FP (2005) Manipulating enteric methane emissions and animal performance of late-lactation dairy cows through concentrate supplementation at pasture. *Journal of Dairy Science* **88**, 2836–2842. doi:10.3168/jds.S0022-0302(05)72964-7
- McCaughey WP, Wittenberg K, Corrigan D (1999) Impact of pasture type on methane production by lactating beef cows. *Canadian Journal of Animal Science* **79**, 221–226. doi:10.4141/A98-107
- Mendoza MG, Pinos JM, Ricalde V, Aranda IE, Rojo RR (2003) Simulation model to estimate the caloric balance of cattle grazing. *Interciencia* **28**, 202–207.
- Mieres JM, Assandri L, Cuneo M (2004) Tablas de valor nutritivo de alimentos. In 'Guía para la alimentación de rumiantes'. Serie Técnica No. 142. (Ed. JM Mieres) pp. 17–47 (INIA Ediciones: Uruguay)
- Moorby JM, Fleming HR, Theobald VJ, Fraser MD (2015) Can live weight be used as a proxy for enteric methane emissions from pasture-fed sheep? *Scientific Reports* **5**, 17915. doi:10.1038/srep17915
- Muñoz C, Hube S, Morales JM, Yan T, Ungerfeld EM (2015) Effects of concentrate supplementation on enteric methane emissions and milk production of grazing dairy cows. *Livestock Science* **175**, 37–46. doi:10.1016/j.livsci.2015.02.001
- NRC (2016) 'Nutrient requirements of beef cattle.' National Research Council, 8th Rev. Edn. (National Academies Press: Washington, DC) Available at <https://www.nap.edu/download/19014#> [Verified 18 February 2017]
- Pinares-Patiño C, Baumont R, Martin C (2003) Methane emissions by Charolais cows grazing a monospecific pasture of timothy at four stages of maturity. *Canadian Journal of Animal Science* **83**, 769–777. doi:10.4141/A03-034
- Pinares-Patiño C, Gere JI, Williams K, Gratton R, Juliarena P, Molano G, MacLean S, Sandoval E, Taylor G, Koolgaard J (2012) Extending the collection duration of breath samples for enteric methane emission estimation using the SF₆ tracer technique. *Animals (Basel)* **2**, 275–287. doi:10.3390/ani2020275
- Prigge EC, Varga GA, Vicini JL, Reid RL (1981) Comparison of ytterbium chloride and chromium sesquioxide as fecal indicators. *Journal of Animal Science* **53**, 1629–1633. doi:10.2527/jas1982.5361629x
- Ramírez-Restrepo CA, Clark H, Muetzel S (2016) Methane emissions from young and mature dairy cattle. *Animal Production Science* **56**, 1897–1905. doi:10.1071/AN15102
- Rogel J, Elzen M, Höhne N, Fransen T, Fekete H, Winkler H, Schaeffer R, Sha F, Riahi K, Meinshausen M (2016) Paris Agreement climate proposals need a boost to keep warming well below 2°C. *Nature* **534**, 631–639. doi:10.1038/nature18307
- Savian JV, Neto AB, de David DB, Bremm C, Schons RMT, Genro TCM, do Amaral GA, Gere J, McManus CM, Bayer C, de Faccio Carvalho PC (2014) Grazing intensity and stocking methods on animal production and methane emission by grazing sheep: Implications for integrated crop-livestock system. *Agriculture, Ecosystems & Environment* **190**, 112–119. doi:10.1016/j.agee.2014.02.008
- Shapiro S, Wilk M (1965) An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika* **52**, 591–611. doi:10.1093/biomet/52.3-4.591
- Short FJ, Gorton P, Wiseman J, Boorman KN (1996) Determination of titanium dioxide added as an inert marker in chicken digestibility studies. *Animal Feed Science and Technology* **59**, 215–221. doi:10.1016/0377-8401(95)00916-7
- Terry RA, Tilley JMA (1964) The digestibility of the leaves and stems of perennial ryegrass, cocksfoot, timothy, tall fescue, lucerne and sainfoin, as measured by an *in vitro* procedure. *Grass and Forage Science* **19**, 363–372. doi:10.1111/j.1365-2494.1964.tb01188.x
- Van Soest PJ, Robertson JB, Lewis BA (1991) Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science* **74**, 3583–3597. doi:10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2
- Velazco JI, Herd RM, Cottle DJ, Hegarty RS (2017) Daily methane emissions and emission intensity of grazing beef cattle genetically divergent for residual feed intake. *Animal Production Science* **57**, 627–635. doi:10.1071/AN15111

11.3. ANEXO III – PUBLICACIÓN III

Association between residual feed intake (RFI) and enteric methane emissions in Hereford steers

Y. Dini^{*}, C. Cajarville^{*†}, J.I. Gere[‡], S. Fernandez[§], M. Fraga[¶], M.I. Pravia[¶], E.A. Navajas[¶], V. S. Ciganda[¶]

^{*}Departamento de Nutrición Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Ruta 1 km 42.5, San José, Uruguay, 80100. [†]UIDI, Facultad Regional Buenos Aires, Universidad Tecnológica Nacional. Medrano 951. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina, 1179. [‡]Departamento de Microbiología, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Montevideo, Uruguay, 11600. [§] Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (Plataforma de salud animal and [¶]Programa de Producción y Sustentabilidad Ambiental) Ruta 50, km 11, Estación Experimental La Estanzuela, Colonia, Uruguay, 70006. [¶]Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, Ruta 48 km 10, Estación Experimental Las Brujas, Las Piedras, Canelones, Uruguay, 90200.

[†]Corresponding author: ccajarville@fvvet.edu.uy

© The Author(s) 2018. Published by Oxford University Press on behalf of the American Society of Animal Science.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>), which permits non-commercial re-use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. For commercial re-use, please contact journals.permissions@oup.com

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the Uruguayan Hereford Breeders Association, Ministry of Livestock, Agriculture and Fishery, National Meat Institute, Clemente Estable Biological Research Institute and Rural Association of Uruguay. Financial support was partially provided by the National Agency for Research and Innovation (grant RTS_1_2012_1_3489 and POS_NAC_2013_1_11_718). We are also grateful to our collaborators, Julieta Mariotta, Ana Rabaza, Juan de La Fuente and Diego Romaso.

Accepted Manuscript

ABSTRACT

The objective of this study was to quantify the emissions of enteric CH₄ from growing Hereford steers raised under feedlot conditions based on contrasting levels of residual feed intake (RFI). A repeated measurements experiment was conducted over 20-d to determine CH₄ production from two groups of nine Hereford steers, with contrasting RFI values (mean ± SD): LRFI group (-0.78 ± 0.22 kg DMI/d) vs. HRFI group (0.83 ± 0.34 kg DMI/d). Steers were selected from a larger contemporary population in which the RFI was evaluated. Steers were maintained under confined conditions with *ad libitum* access to water and feed, comprising a total mixed ration of 55% sorghum silage, 21% barley silage, 21% corn grain, and 3% protein-mineral-vitamin-premix, provided twice a day. Before the beginning of CH₄ measurements, the live weight (LW) of both groups of animals was determined, which on average (± SEM) was 357.0 ± 5.11 kg and 334.0 ± 10.17 kg in the LRFI and HRFI groups, respectively. Methane emission (g/d) was measured on each animal with the sulfur hexafluoride (SF₆) tracer technique, during two consecutive periods of five days. Individual daily intake and feeding behavior characteristics were measured using a GrowSafe automated feeding system (Model 6000, GrowSafe Systems Ltd., Airdrie, Alberta, Canada). Methanogens in the ruminal content were quantified using qPCR with primers targeting the *mcrA* gene. Methane emission was near 27% lower in animals with LRFI when expressed in absolute terms (g/d) (26.8%; *P* = 0.009), by unit of dry matter intake (g CH₄/kg) (27.9%, *P* = 0.021), or as % of gross energy intake (26.7%; *P* = 0.027). These differences could not be explained by differences in amount of total of methanogens (average = 9.82 log₁₀ units; *P* = 0.857). However, there were some differences in animal feeding behavior that could explain these differences (e.g., LRFI animals tended to spend less time in feeders). Our results suggest that, in Hereford steers, the selection by RFI values is a promising mitigation strategy for the reduction of the emission of enteric CH₄.

Key words: feeding behavior, enteric methane, methanogens, residual feed intake, steers.

INTRODUCTION

Emissions from global livestock represent 14.5% of anthropogenic greenhouse gases emissions and 44% of livestock emissions are in the form of methane (CH₄) (FAO, 2013). There are several alternatives to reduce CH₄ emissions such as improving feed quality, using CH₄ inhibitors and breeding for lower CH₄.

Residual feed intake (RFI) is calculated as the difference between observed and predicted animal intake in relation to performance. Negative RFI values indicate high efficiency of converting feed to products. According to Arthur and Herd (2005), RFI has been described as an animal characteristic of medium heritability, which has been associated with CH₄ emissions (Cassandro et al., 2013). Animals with low RFI are reported to be more efficient (consume less feed than expected at equal body weight and gain) and produce less emissions compared with high RFI animals (Basarab et al., 2013). Consequently, animal selection for low RFI has been proposed as an alternative to mitigate CH₄ emissions (Hegarty et al., 2007; Basarab et al., 2013; Pickering et al., 2015; de Hass et al., 2017) although some studies on grazing conditions did not find differences between divergent RFI animals (Velazco et al., 2017). Up to now, research on this topic is limited. Although it is recognized that RFI selection will contribute for reducing CH₄ emission intensity (emissions per unit of product; Wagorn and Hegarty, 2011), some authors reported no differences between low and high RFI animals in emission per kg of DM ingested (Hegarty et al., 2007). Inconsistencies among results may have been caused by different, and sometimes limited RFI ranges used in the experiments. Other animal characteristics, such as feeding behavior or microbiota, have not been reported quantitatively as secondary variables for the interpretation of CH₄ emission related to RFI.

Most information available regarding this topic has been developed on dairy cattle or Angus beef cattle. Hereford is one of the few beef cattle breeds publishing estimated breeding

values for RFI (i.e. Uruguay and Canada, Ravagnolo et al., 2018). It would be of interest the study of the association of this new trait with CH₄ emission on the breed.

The goal of this study was to quantify the emissions of enteric CH₄ from growing Hereford steers under confined conditions in relation to contrasting levels of RFI.

MATERIALS AND METHODS

The study was carried out in December 2014 at Kiyú Test Station of the Hereford Breeders Association located in San José, Uruguay (GPS Coordinates: S Latitude 34° 35.797', W length 56° 42.302').

Experimental Design, Treatments, Animals and Management

The study was conducted with 112 Hereford steers that were part of a three-year project, with the goal of building a training population of 1000 animals for genomic selection for RFI in the Uruguayan Hereford breed (Navajas et al., 2014). The 112 animals corresponded to one of the three RFI tests of the first year of the project and were originally obtained from five commercial farms.

The estimate of RFI was based on measurements of individual feed intake using the GrowSafe automated feeding system (Model 6000, GrowSafe Systems Ltd., Airdrie, Alberta, Canada), in two pens with eight feeders each, with *ad libitum* access to water and food. Individual feed intake data used for RFI calculation were recorded during a conventional 70-d test, after 28-d of adaptation to diet and feeding system. Animals were fed twice a day with a fully mixed ration (TMR) of sorghum silage, barley silage, corn grain and protein-mineral-vitamin-premix (Table 1).

Insert Table 1 here

After completing the test, the 112 steers were ranked based on their RFI values that were computed based on the following model as proposed by Basarab et al. (2003), based on Koch et al. (1963) (Eq.1):

$$\text{DMI}_{ij} = b_0 + b_1 \cdot \text{ADG}_i + b_2 \cdot \text{MLW}_i + b_3 \cdot \text{BFat}_i + e_{ij} \quad (1)$$

Where DMI was the dry matter intake (kg), ADG was average daily gain (kg/d), MLW_i was the metabolic weight defined as mid test LW^{0.75} (kg), Bfat was the subcutaneous fat depth measured at the end of test by ultrasound (mm), b₀ is the intercept and b₁, b₂ and b₃ were the partial regression coefficients for each trait on DMI. The residual (e) is taken to represent RFI. The effect of pen was not included because preliminary analysis indicated that it was no significant (*P* > 0.01). The R² of the multiple regression used for RFI estimation was 0.80.

Dry matter intake (DMI) was calculated as the average of 68 valid daily records adjusted by the dry matter percentage. Live weight measurements were performed every 14-d, early in the morning and without fasting. Two consecutive days of LW measurements were used for the initial, middle and final weight and one for intermediate measurements. The ADG was calculated by the regression of all LW during the test, considering only those with R² ≥ 0.95. Subcutaneous dorsal fat depth was measured by ultrasound by certified technicians using the Aloka SSD 500 unit, equipped with a linear matrix transducer of 3.5 MHz and 17.2 cm (Aloka Co. Ltd., Tokyo, Japan). The ultrasound images were collected in the field and interpreted later with the off-line interpretation software Biosoft Toolbox® (version 2.1 of Biotronics Inc.).

Based on the RFI ranking, two groups of nine steers (18 animals) with extreme RFI values were selected for the present study (mean ± SD: -0.78 ± 0.22 kg DMI/d vs. 0.83 ± 0.34 kg DMI/d). Both groups were confined for 20 more days and fed the same diet with same feeding regime used during the RFI test. Dry matter intake and feeding behavior characteristics were measured using a GrowSafe automated feeding system. Each feeding event was registered for

all the animals according to Basarab et al. (2003), and individual data of duration feeding events, head down times and meal size were used to calculate meal duration time (s), average meal size (kg), meals per day, head down duration (s), head down duration per meal (s), and feed rate (g/s).

A statistical experimental design of repeated measurements over time, including two treatments and two 5-d measurement periods, was used. The treatments consisted of the two contrasting levels of residual feed intake (RFI) of the animals: low RFI (LRFI) and high RFI (HRFI).

Accepted Manuscript

Determination of CH₄ Emissions

The sulfur hexafluoride (SF₆) tracer technique (Johnson et al., 1994), as modified by Gere and Gratton (2010), was used to quantify daily methane (CH₄) emissions. Eight days before beginning the CH₄ measurements, eight animals from each RFI group (a total of 16 animals) were given an oral permeation tube filled with sulfur hexafluoride (SF₆) using a plastic dosing applicator. The SF₆ in the tube was used as a marker for gas emissions. Background concentrations of CH₄ and SF₆ were measured during the same period. Two animals (one of each RFI group) were used as control of SF₆ background, so the SF₆ permeation tubes were not administered. For CH₄ background (environmental baseline), a collection container was placed inside the pen. Daily permeation rates (PR) of SF₆ from the tubes averaged (mean ± SEM) 6.0 ± 0.55 mg/d and 5.9 ± 0.58 mg/d in the LRFI and HRFI groups, respectively. The emission of enteric CH₄ was measured for the 18 animals during two consecutive five-day periods following the procedure performed by Dini et al. (2017). The first eight days of the study were used for the adaptation of the animals to the use of the CH₄ collection containers and for the stabilization of rumen SF₆ levels. During the study, the LW of the animals was recorded at the beginning and at the end of each measurement period. The average LWs were (mean ± SEM) 357.0 ± 5.11 kg and 334.0 ± 10.17 kg in the LRFI and HRFI groups, respectively.

The collection of exhaled and eructated gas was performed using two 0.5 L stainless steel containers per animal. At the beginning of each period, these containers were evacuated, cleaned with N₂ and placed on each side of the animal's head. At the end of each period, the containers were removed from the animals and the post-sampling pressure was measured. Containers with pressure values of 400 to 600 mb were considered valid according to Gere and Gratton (2010) and Gere (2012), as this manipulation ensures good quality samples. Less than 10% of the containers with pressure values <400 mb were considered atypical, and therefore removed from the experiment. Five sub-samples were extracted from each container, stored in

12 mL vacutainers (Exetainer®; Labco Ltd., Lampeter, Ceredigion, UK), and analyzed using a gas chromatograph (Agilent 7890A, Santa Clara, CA, USA) with a Flame Ionization Detector (FID) and an Electron Capture Detector (ECD) for determining CH₄ and SF₆ concentrations, respectively. After obtaining a chromatographic analysis of samples, CH₄ emissions per animal were calculated using the permeation rate (PR) of each SF₆ capsule and the concentrations above the background of CH₄ and SF₆ (in ppm and ppt, respectively) using the following equation (Eq. 2):

$$\text{CH}_4 \text{ (g/d)} = \text{PR SF}_6 \text{ (g/d)} \times [\text{CH}_4] / [\text{SF}_6] \quad (2)$$

Determination of Amount of Total Methanogens

After completing the second CH₄ measurement period, the 18 steers were reincorporated to the original herd, and maintained on grazing conditions for six to ten months until slaughter. During the summer they grazed on sorghum pasture (*Sorghum vulgare*) in a vegetative stage, supplemented with sorghum silage, followed by oat pasture (*Avena sativa*) also in vegetative stage with corn grain supplementation of 6 kg/steer until slaughter. Steers were slaughtered when they reached 500 kg LW (607 ± 11.6-d average age of the slaughter). At the time of slaughter, ruminal content was sampled and stored at -80°C until use. Deoxyribonucleic acid (DNA) was extracted and quantification of the number of copies of the methyl coenzyme-M reductase gene (*mcrA*) was determined by the quantitative polymerase chain reaction (qPCR). This gene was used as a functional marker to enumerate methanogens (Luton et al., 2002). Reactions (25 µL) were performed in a BioRad CFX 96 thermocycler using Power SYBR™ Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) and primers qmrcA-F and qmrcA-R; reaction conditions were the same as in Denman et al. (2007). Standard curves for absolute quantification and efficiency estimation were performed according to Fraga et al. (2015). Three

replicates of each DNA sample (20 ng) were used. A non-template (sterile distilled water) negative control was loaded on each plate run.

Chemical Analysis

Samples were taken daily from the total mixed ration (TMR) and were weighed and dried at 60 °C for 48 h. They were ground to pass through a 1-mm screen and analyzed to determine chemical composition. DM, ash (A) and total nitrogen (CP= N x 6.25) content were analyzed according to AOAC (1990; methods ID 934.01, ID 942.05 and ID 955.04, respectively). The NDF was analyzed with heat stable amylase and sodium sulfite. ADF and ADL were determined using the methods of Van Soest et al. (1991), including residual ash. The *in vitro* digestibility was determined according to Tilley and Terry (1963), and gross energy (GE) was determined with an adiabatic bomb calorimeter (Autobomb Gallenkamp; Loughborough, Leics, United Kingdom).

Statistical Analysis

Data were analyzed using version 9.0 of SAS software (SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA). Intake and CH₄ emissions data were analyzed as repeated measures, with the steers as the subject of the repeated measurements, using the PROC MIXED procedure according to the following model (Eq. 3):

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + P_j + (TxP)_{ij} + e_{ijk} \quad (3)$$

which included the fixed effect of the treatment (T_i = LRFI and HRFI), the fixed effect of the period (P_j = 1 and 2), their interaction [$(TxP)_{ij}$], and the residual error (e_{ijk}).

Daily weight gain, feeding behavior variables and the number of copies per mg of the mcrA gene obtained from the ruminal content were analyzed using the PROC MIXED procedure of

SAS (SAS Inst. Inc., Cary, NC), with the animal as the experimental unit according to the following model (Eq. 4):

$$Y_i = \mu + T_i + e_i \quad (4)$$

which included the fixed effect of the treatment (T_i = LRFI and HRFI).

Means were compared with a Tukey–Kramer test. Normality test was applied to all variables (Shapiro and Wilk, 1965). Data of copies of *mrcA*/mg, average meal size, meal duration time and feed rate had heterogeneous variances and therefore were analyzed after logarithmic transformation. These data were analyzed by PROC MIXED as previously described. The average values were considered different when $P \leq 0.05$ and tended to differ if $0.05 \leq P \leq 0.10$.

Accepted Manuscript

Downloaded from <https://academic.oup.com/baf/advance-article-abstract/doi/10.1093/baf/bfy111/5112978> by guest on 20 November 2018

RESULTS

Less efficient animals (HRFI) had a higher DMI and produced more CH₄ than the most efficient animals (LRFI), but there were no differences in the ADG (mean = 0.82 kg/d; $P = 0.923$) (Table 2) between the groups evaluated. The most efficient animals spent less time eating ($P < 0.001$), remained less time with the head down ($P = 0.029$) and their feed rate tended to be higher ($P = 0.062$) respect to HRFI ones (Table 2). However, no differences were found in average meal size (mean = 0.90 kg, $P = 0.549$), in the number of meals (mean = 13.2, $P = 0.627$) or in the time they remained with their heads down at each meal (mean = 347.8 s, $P = 0.141$).

Insert Table 2 here

The most efficient animals (LRFI) exhibited a 26.8% lower CH₄ emission (g/d) and a lower CH₄ yield when expressed as g/kg DMI (27.9%) or as percent of GEI (26.7%) compared with HRFI animals (Table 3).

Insert Table 3 here

There were no differences in the amount of total methanogens between treatments, as the average number of copies of the *mcrA* gene was similar (mean = 9.82 log₁₀ units; $P = 0.86$; Fig. 1). The amplification efficiency of the qPCR reaction calculated from the standard curve was 96.6% with $R^2 = 0.99$, ensuring accuracy of the method.

DISCUSSION

The current study confirmed that high conversion efficient animals with low values of RFI consume a lower quantity of feed and dedicate less time to meals (12 and 23% less in this case, respectively). The lower time spent eating has been proposed by Basarab et al. (2013) as one of the mechanisms involved in the higher efficiency, associated with lower energy spent in feeding activities.

Average methane emissions (194 and 265 g/d for LRFI and HRFI respectively), were comparable to those observed by Manafiazar et al. (2016) and Alemu et al. (2017) for crossbred beef replacement heifers using the GreenFeed system (205 and 202-222 g/d, respectively). As expected, LRFI animals, with a RFI average of -0.78 kg DMI/d, emitted up to 27% less CH₄ than the HRFI animals, with a RFI average of 0.83 kg DMI/d. The less time dedicated to meal led to a strong tendency for a higher ingestion rate of the more efficient animals. In this sense, it is demonstrated that animals with higher intake rates also have faster passage rates of particles in the rumen, which is not necessarily associated with lower digestibility (Pérez-Ruchel et al., 2013), at least for high-quality diets. In our study, a higher rate of passage of the rumen particles could explain the lower CH₄ emission in LRFI animals (Nkrumah et al., 2006). However, different associations between RFI and methane emissions have been previously reported. A recent study by Alemu et al. (2017) used both GreenFeed system and respiration chambers to evaluate CH₄ emissions of crossbred beef heifers of high and low RFI. These authors reported that low and high RFI animals emitted similar CH₄ per day and per kg DMI when measured in respiration chambers, but there were differences in daily CH₄ emissions when the GreenFeed system was used. Meanwhile Velazco et al. (2017) found higher predicted DMI and higher CH₄ emissions in lower RFI Angus yearling steers and heifers under grazing conditions. Although these results were attributed to diet quality, it would be necessary to take into account other variables affecting RFI, including feeding behavior characteristics (not reported in the aforementioned study) and feeding type and conditions (grazing vs. confined).

In this study, differences in CH₄ emissions could not be directly associated with differences in *mcrA* quantification, as also observed in previous studies (Zhou et al., 2011; Danielsson et al., 2012; Rira et al., 2016), indicating that animals with low values of RFI do not necessarily present less Archaea populations. However, it is necessary to point out that in our study rumen content was obtained at slaughter after six to nine months of finishing under grazing conditions, which started when the CH₄ measurements were completed. Wallace et al. (2014) studied microbiome and methane emissions on beef cattle consuming different diets and observed that the rates archaea/bacteria were similar in rumen samples collected in vivo and post-mortem, as well as the correlation between archaea/bacteria and methane emission, with independence of the diet. Since the RFI is an intrinsic condition of the animal, differences between low and high RFI groups on CH₄ emissions and microbiome characteristics should persist along the life with independence of the diet consumed. However, some authors have suggested that the relationship between RFI and methane emission depends on the diet (Velazco et al., 2017). According to Jones et al. (2011), lower RFI cows produced less CH₄ than those of high RFI only when they were fed a high-quality pasture. Based on the scarce existing information about the relationship between the RFI, methane emission and microbiome, it is necessary to consider that the different diet consumed could have weakened the association between Archaea populations and methane emissions in lower and higher RFI groups. Additionally, methanogen quantification could not represent actual methanogenic activity. In future studies, quantification of *mcrA* mRNAs should shed light on understanding methanogens activity. There are recent studies that question the use of RFI as a strategy to mitigate enteric CH₄ emissions (Jones et al., 2011; Alemu et al., 2017; Velazco et al., 2017). However, it should be noted that in these prior studies, the populations used did not present a strong divergence in RFI, which may have affected the results in relation to the emission of CH₄. Jones et al. (2011) reported that the evaluated populations had average RFI values of -0.69 vs. 0.68 kg/d, while Alemu et al. (2017) reported values of -0.25 vs. 0.29. In our study, the evaluated animals presented a greater contrast in the values of RFI

(-0.78 vs. 0.83 kg/d). Further, Nkrumah et al. (2006) found differences in CH₄ emissions with animal populations displaying a high RFI contrast (-1.18 vs. 1.25 kg/d).

The results of this study show that animals with lower RFI emit less CH₄, indicating that selection by the level of RFI is a promising mitigation strategy, which can be used synergistically with the management of dietary components. Future research should investigate the association between the RFI and the quantity and activity of methanogens, as well as between these and the emission of CH₄. This will provide a more comprehensive understanding of the potential and scope of RFI on the reduction of CH₄ emission.

Accepted Manuscript

LITERATURE CITED

- Alemu, A. W., D. Vyas, G. Manafiazar, J. A. Basarab, and K. A. Beauchemin. 2017. Enteric methane emissions from low and high residual feed intake beef heifers measured using GreenFeed and respiration chamber techniques. *J. Anim. Sci.* 95:3727–3737.
- AOAC. 1990. Official methods of analysis. 15th ed. Assoc. Off. Anal. Chem., Arlington, VA.
- Arthur, P. F., R. M. Herd. 2005. Efficiency of feed utilisation by livestock – implications and benefits of genetic improvement. *Can. J. Anim. Sci.* 85, 281–290.
- Basarab, J. A., M. A. Prince, J.L. Aalhus, E.K. Okine, W.M. Snelling, K.L Lyle. 2003. Residual feed intake and body composition in young growing cattle. *Can J. Anim.Sci.* 83:189-204
- Basarab, J. A., K. A. Beauchemin, V. S. Baron, K. H. Ominski, L. L. Guan, S. P. Miller, and J. J. Crowley. 2013. Reducing GHG emissions through genetic improvement for feed efficiency: effects on economically important traits and enteric methane production. *Animal.* 7 (s 2):303–315.
- Cassandro, M., M. Mele, and B. Stefanon. 2013. Genetic aspects of enteric methane emission in livestock ruminants. *Ital. J. Anim. Sci.* 12:450–458.
- Danielsson, R., A. Schnürer, V. Arthurson, and J. Bertilsson. 2012. Methanogenic population and CH₄ production in swedish dairy cows fed different levels of forage. *Appl. Environ. Microbiol.* 78:6172–6179.
- Denman, S. E., N. W. Tomkins, and C. S. McSweeney. 2007. Quantitation and diversity analysis of ruminal methanogenic populations in response to the antimethanogenic compound bromochloromethane. *FEMS Microbiol. Ecol.* 62:313–322.
- Dini, Y., J. Gere, C. Briano, M. Manetti, P. Juliarena, V. Picasso, R. Gratton, and L. Astigarraga. 2012. Methane emission and milk production of dairy cows grazing pastures rich in legumes or rich in grasses in Uruguay. *Animals.* 2:288–300.

- Dini, Y., J. I. Gere, C. Cajarville, and V. S. Ciganda. 2017. Using highly nutritious pastures to mitigate enteric methane emissions from cattle grazing systems in South America. *Animal Production Science* ("in press").
- Fraga, M., S. Fernández, C. Cajarville, M. Martínez, J. A. Abin-Carriquiry, and P. Zunino. 2015. *In vitro* modulation of rumen microbiota and fermentation by native microorganisms isolated from the rumen of a fed exclusively on pasture bovine. *Ann. Microbiol.* 65:2355–2362.
- Gerber, P. J., A. N. Hristov, B. Henderson, H. Makkar, J. Oh, C. Lee, R. Meinen, F. Montes, T. Ott, J. Firkins, A. Rotz, C. Dell, A. T. Adesogan, W. Z. Yang, J. M. Tricarico, E. Kebreab, G. Waghorn, J. Dijkstra, and S. Oosting. 2013. Technical options for the mitigation of direct methane and nitrous oxide emissions from livestock: a review. *Animal.* 7:220–234.
- Gere, J. I. 2012. La técnica de trazado por SF₆ para medir emisiones de metano de rumiantes en pastoreo : desarrollos metodológicos y algunas aplicaciones. PhD Thesis, Faculty of Exact Sciences, Tandil, Argentina.
- Gere, J. I., and R. Gratton. 2010. Simple, low cost flow controllers for time averaged atmospheric sampling and other applications. *Lat. Am. Appl. Res.* 40:377–381.
- de Haas, Y., M. Pszczola, H. Soyeurt, E. Wall, and J. Lassen. 2017. Invited review: Phenotypes to genetically reduce greenhouse gas emissions in dairying. *J. Dairy Sci.* 100:855–870.
- Hammond, K. J., J. L. Burke, J. P. Koolgaard, S. Muetzel, C. S. Pinares-Patiño, and G. C. Waghorn. 2013. Effects of feed intake on enteric methane emissions from sheep fed fresh white clover (*Trifolium repens*) and perennial ryegrass (*Lolium perenne*) forages. *Anim. Feed Sci. Technol.* 179:121–132.
- Hegarty, R. S., J. P. Goopy, R. M. Herd, and B. McCorkell. 2007. Cattle selected for lower residual feed intake have reduced daily methane production. *J. Anim. Sci.* 85:1479–1486.

- Johnson, K., M. Huyler, H. Westberg, B. Lamb, and P. Zimmerman. 1994. Measurement of methane emissions from ruminant livestock using a sulfur hexafluoride tracer technique. *Environ. Sci. Technol.* 28:359–362.
- Jones, F. M., F. A. Phillips, T. Naylor, and N. B. Mercer. 2011. Methane emissions from grazing Angus beef cows selected for divergent residual feed intake. *Anim. Feed Sci. Technol.* 166–167:302–307.
- Koch, R.M., L.A. Swiger, D. Chambers, and K. E. Gregory. 1963. Efficiency of feed use in beef cattle. *J. Anim. Sci.* 22:486–494.
- Luton, P. E., J. M. Wayne, R. J. Sharp, and P. W. Riley. 2002. The *mcrA* gene as an alternative to 16S rRNA in the phylogenetic analysis of methanogen populations in landfill. *Microbiology.* 148:3521–3530.
- Manafiazar, G., S. Zimmerman, and J. Basarab. 2016. Repeatability and variability of short-term spot measurement of methane and carbon dioxide emissions from beef cattle using GreenFeed Emissions Monitoring System. *Can. J. Anim. Sci.* 126:CJAS-2015-0190.
- Muñoz, C., S. Hube, J. M. Morales, T. Yan, and E. M. Ungerfeld. 2015. Effects of concentrate supplementation on methane emissions and milk production of grazing dairy cows. *Livest. Sci.* 175:37–46.
- Navajas, E., M. J. Pravia, M. Lema, J. Clariget, I. Aguilar, G. Brito, P. Peraza, M. Dalla Rizza, and F. Montossi. 2014. Genetic improvement of feed efficiency and carcass and meat quality of Hereford cattle by genomics. *Proc. 60th Int. Congr. Meat Sci. Technol., ICoMST.* p. 17–20.
- Nkrumah, J. D., E. K. Okine, G. W. Mathison, K. Schmid, C. Li, J. A. Basarab, M. A. Price, Z. Wang, and S. S. Moore. 2006. Relationships of feedlot feed efficiency, performance, and feeding behavior with metabolic rate, methane production, and energy partitioning in beef cattle. *J. Anim. Sci.* 84:145–153.

- Pérez-Ruchel, A., J. L. Repetto, and C. Cajarville. 2013. Suitability of live yeast addition to alleviate the adverse effects due to the restriction of the time of access to feed in sheep fed only pasture. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl)*. 97:1043–1050.
- Pickering, N. K., V. H. Oddy, J. Basarab, K. Cammack, B. Hayes, R. S. Hegarty, J. Lassen, J. C. McEwan, S. Miller, C. S. Pinares-Patiño, and Y. de Haas. 2015. Animal board invited review: genetic possibilities to reduce enteric methane emissions from ruminants. *Animal*. 9:1431–1440.
- Ravagnolo, O., I. Aguilar, J.J., Crowley, M.I., Pravia, M., Lema, F.L., Macedo, S., Scott, E.A., Navajas. 2018. Accuracy of genomic predictions of residual feed intake in Hereford with Uruguayan and Canadian training populations. *Proc. of the World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, Volume Electronic Poster Session - Species - Bovine (beef) 1*, 723.
- Rira, M., D. P. Morgavi, M. Popova, C. Marie-Magdeleine, T. Silou-Etienne, H. Archimède, and M. Doreau. 2016. Ruminal methanogens and bacteria populations in sheep are modified by a tropical environment. *Anim. Feed Sci. Technol.* 220:226–236.
- Roberts, A., R. Funston, T. Mulliniks, M. Petersen, and M. MacNeil. 2011. Feed efficiency-how should it be used for the cow herd?. *Proc. 22th Range Beef Cow Symp*, Mitchell, Nebraska. <http://www.rangebeefcow.com/2011/newsroom.html> [accessed Feb 17, 2018].
- Tilley, J. M. A., R. A. Terry. 1963. A two-stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops. *J. Br. Grassl. Soc.* 18:104–111.
- Van Soest, P. J., J. B. Robertson, B. A. Lewis. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74:3583–3597.
- Velazco, J. I., R. M. Herd, D. J. Cottle, and R. S. Hegarty. 2017. Daily methane emissions and

emission intensity of grazing beef cattle genetically divergent for residual feed intake. *Anim. Prod. Sci.* 57:627–635.

Waghorn, G. C., R. S. Hegarty. 2011. Lowering ruminant methane emissions through improved feed conversion efficiency. *Anim. Feed Sci. Technol.* 166–167:291–301.

Wallace, R. J., J. A. Rooke, C. A. Duthie, J. J. Hyslop, D. W. Ross, N. McKain, S. M. De Souza, T. J. Snelling, A. Waterhouse, and R. Roehe. 2014. Archaeal abundance in post-mortem ruminal digesta may help predict methane emissions from beef cattle. *Sci. Rep.* 4:1–8.

Zhou, M., Y. H. Chung, K. A. Beauchemin, L. Holtshausen, M. Oba, T. A. McAllister, and L. L. Guan. 2011. Relationship between rumen methanogens and methane production in dairy cows fed diets supplemented with a feed enzyme additive. *J. Appl. Microbiol.* 111:1148–1158.

Accepted Manuscript

Table 1. Ingredients and chemical composition of total mixed ration (TMR)

Diet ingredient, % (as-fed basis)	
Sorghum silage	55
Barley silage	21
Corn grain	21
Protein-mineral-vitamin premix ¹	3
Chemical composition	
DM, %	44.95
CP, %	12.57
NDF, %	47.59
ADF, %	30.87
TDN, % ²	64.11
A, %	7.94
ADL, %	9.30
DMD, %	65.02
GE, Mcal/kg DM	3.93
ME, Mcal/kg DM ³	2.31

¹Soybean meal 77%, Mycosorb® 0.9%, Rumensin® 0.3%, Urea 8.1%, CaCO₃ 7.3%, NaCl 5.5%, Rovimix Feedlot® 0.9%;

²TDN=Total digestible nutrients = 96.03 - (1.034 × ADF, %) (Alemu et al., 2017);

³ME, MJ/kg DM = [(TDN, %/100) × 4.4 Mcal/kg TDN] × 4.184 MJ DE/Mcal × 0.82 MJ ME/MJ DE (Alemu et al., 2017). Values are means.

Table 2. Intake, daily gain and feeding behavior characteristics for two contrasting levels of residual feed intake (RFI) of the animals: lower RFI (LRFI, -0.78 ± 0.22 kg DMI/d) and higher RFI (HRFI, 0.83 ± 0.34 kg DMI/d) steers

	LRFI	HRFI	SEM	P-value
Intake, kg DM/d	9.33	10.6	0.33	0.014
GEI, Mcal/d	37.1	42.3	1.32	0.014
ADG, kg/d	0.83	0.80	0.190	0.923
Feed rate, g/s	4.05	2.75	--	--
Feed rate, log ₁₀	1.32	0.98	0.120	0.062
Meal duration time, s	11802	15404	397.7	<.0001
Average Meal Size, kg	0.81	0.98	--	--
Average Meal Size, log ₁₀	-0.23	-0.12	0.121	0.549
Meals per day	12.8	13.6	1.14	0.627
Head down duration/meal, s	265	431	--	--
Head down duration/meal, log ₁₀	5.47	5.89	0.190	0.141
Head down duration, s	3024	4519	440.9	0.029

DMI= dry matter intake; GEI= gross energy intake; ADG= average daily gain. Values are average per treatment (n= 8/treatment).

Table 3. Emission of CH₄ for two contrasting levels of residual feed intake (RFI) of the animals: low RFI (LRFI, -0.78 ± 0.22 kg DMI/d) and high RFI (HRFI, 0.83 ± 0.34 kg DMI/d) steers

	Treatment			P-value		
	LRFI	HRFI	SEM	Treatment	Period	Treat*Per
Emissions, g/d	194	265	15.9	0.009	0.423	0.911
CH ₄ /kg DMI, g/kg	20.3	28.1	1.76	0.021	0.107	0.390
Ym, %	6.72	9.17	0.580	0.027	0.102	0.391
CH ₄ /kg NDFI, g/kg	43.0	59.2	3.73	0.024	0.103	0.396
CH ₄ /kg ADFI, g/kg	65.4	92.0	5.69	0.015	0.106	0.398

Treat*Per= interaction between treatment and period; Emissions= daily CH₄ emissions; CH₄/kg DMI= CH₄ emission per kilogram of dry matter intake; Ym= methane yield; CH₄/kg NDFI= CH₄ emission per kilogram of neutral detergent fiber intake; CH₄/kg ADFI= CH₄ emission per kilogram of acid detergent fiber. Values are average per treatment (n= 8/treatment).

11.4. ANEXO IV – PERMISO REVISTA VETERINARIA



Sociedad de Medicina Veterinaria del Uruguay

Montevideo, 17 de abril de 2018

Estimada Ing. Agr. Yoana Dini:

La Revista Veterinaria (Montevideo) autoriza la reproducción del artículo de Dini y col (2017), vol. 54, n° 208, pag.4-9, a los fines de ser incorporado en el documento de Tesis.

Se hace notar que la reproducción total o parcial de cualquier artículo de la revista debe contener la mención completa de la fuente.

Atentamente,

Dr. Rodrigo Puentes

Revista Veterinaria (Montevideo)

<http://www.revistasmvu.com.uy/>

<http://www.scielo.edu.uy>

Sociedad de Medicina Veterinaria del Uruguay
e-mail: smvu@smvu.com.uy website: www.smvu.com.uy
Tel.: (00598 2) 408 6174 Fax: (00598 2) 409 9458
Cerro Largo 1895 – CP 11200 – Montevideo – Uruguay