



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA



**“AMBIENTE RUMINAL Y EMISIONES DE METANO EN VACAS LECHERAS
ALIMENTADAS CON DIETAS MIXTAS (PASTURA + RACIÓN TOTALMENTE
MEZCLADA)”**

Por

BIGOT VIERA, José Luis
FONTES RODRÍGUEZ, Diego Martín
MONTINI MARICHAL, Josefina Aldana

TESIS DE GRADO presentada como uno de
los requisitos para obtener el título de Doctor
en Ciencias Veterinarias
Orientación: Producción Animal

MODALIDAD: Ensayo Experimental

MONTEVIDEO
URUGUAY
2023

Tesis de grado aprobada por:

Presidente de mesa:




PhD. Francisco Diéguez

Segundo miembro (Tutor):




PhD. Gonzalo Fernández

Tercer miembro:



PhD. Alejandro Britos

Cuarto miembro (Co tutor):




PhD. Verónica Ciganda

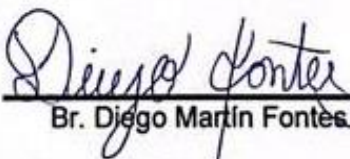
Fecha:

14/02/2023


Autores:



Br. José Luis Bigot Viera



Br. Diego Martín Fontes Rodríguez



Br. Josefina Aldana Montini Marichal

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, queremos agradecer a nuestras familias por brindarnos la oportunidad de estudiar y el aguante de todos estos años de carrera.

Un especial agradecimiento al grupo humano que se formó en el trabajo de campo conformado por Nicolas, Santiago, Guido y Juan, ya que sin ellos las actividades hubiesen sido muy difíciles de llevar a cabo.

El grupo desea agradecerle a nuestro tutor Gonzalo Fernández y cotutora Verónica Ciganda, por estar presente en todo el proceso y el apoyo constante.

A Walter y Yanela por su paciencia y buena onda.

A los integrantes del laboratorio por la orientación brindada.

A Marina por incentivarnos cuando las cosas se complicaban un poco.

A los integrantes de INIA La Estanzuela que participaron en la recolección y análisis del metano.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN	7
SUMMARY	8
1. INTRODUCCIÓN	9
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	10
2.1. Estrategias nutricionales para vacas lecheras.....	10
2.1.1 Sistemas pastoriles.....	10
2.1.2 Sistemas de ración totalmente mezclada (RTM).....	11
2.1.3 Sistemas que combinan RTM y pastura fresca.....	12
2.2. Ambiente ruminal.....	13
2.2.1 pH	13
2.2.2 Ácidos grasos volátiles (AGV).....	14
2.2.3 Nitrógeno amoniacal (NH ₃).....	15
2.3. Metano (CH ₄) en rumiantes.....	15
3. HIPÓTESIS	18
4. OBJETIVOS	19
4.1. Objetivo general.....	19
4.2. Objetivos específicos	19
5. MATERIALES Y MÉTODOS	20
5.1. Animales, diseño experimental y alimentos	20
5.1.1 Manejo de los animales y de la alimentación.....	23
5.2. Determinaciones (período de mediciones)	23
5.2.1 Consumo de nutrientes.....	23
5.2.2 Parámetros ruminales.....	24
5.2.3 Emisiones de metano entérico.....	24
5.3. Análisis químicos.....	25
5.4. Análisis estadísticos.....	26
6. RESULTADOS	27
7. DISCUSIÓN	33
8. CONCLUSIÓN	37
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

	Pág.
Tabla 1. Composición química de la alfalfa fresca, de la RTM y de los ingredientes utilizados en los dos períodos experimentales.....	22
Tabla 2. Consumo de materia seca (Kg/d) en vacas lecheras alimentadas con una dieta 100% RTM (T100) o 60% RTM + alfalfa a voluntad (T60).....	27
Tabla 3. Consumo de nutrientes (Kg MS/d) de vacas lecheras alimentadas con una dieta 100% RTM (T100) o 60% RTM + alfalfa a voluntad (T60).....	28
Tabla 4. pH ruminal, AGV (mmol/L), proporción de acético, propiónico y butírico, y concentración de NH ₃ (mg/dl) en vacas lecheras alimentadas con 100% RTM (T100) o 60% RTM + alfalfa a voluntad (T60) 4 h luego de la primera oferta de RTM del día	29
Tabla 5. pH ruminal, AGV (mmol/L), proporción de acético, propiónico y butírico, y concentración de NH ₃ (mg/dl) en vacas lecheras alimentadas con 100% RTM (T100) o 60% RTM + alfalfa a voluntad (T60) 4 h luego de la oferta de alfalfa fresca en T60	30
Tabla 6. Emisiones de metano y producción de leche en vacas lecheras alimentadas con 100% RTM (T100) o 60% RTM + alfalfa a voluntad (T60)...	31
Figura 1: Vacas con dispositivos recolectores de metano.....	25
Figura 2: Emisiones de CH ₄ en función del peso vivo.....	32

LISTA DE ABREVIATURAS

A:P	Relación acético:propiónico
AGV	Ácidos grasos volátiles
CH ₄	Metano
CMS	Consumo de materia seca
CNF	Carbohidratos no fibrosos
CO ₂	Dióxido de carbono
DEL	Días en leche
ED	Energía digestible
EE	Extracto etéreo
EM	Energía metabolizable
FAD	Fibra ácido detergente
FND	Fibra neutro detergente
GEI	Gases de efecto invernadero
H ₂	Hidrógeno
m.o	Microorganismos
MS	Materia seca
N	Nitrógeno
NH ₃	Nitrógeno amoniacal
NIDA	Nitrógeno insoluble en solución detergente ácida
NIDN	Nitrógeno insoluble en solución detergente neutra
PB	Proteína bruta
PV	Peso vivo
RPM	Ración parcialmente mezclada
RTM	Ración totalmente mezclada

RESUMEN

La intensificación de la producción lechera ha generado nuevas estrategias de alimentación como el uso de RTM con o sin acceso al pastoreo, con el fin de mejorar los costos de alimentación y las propiedades nutraceuticas de la leche. Por otra parte, el creciente interés por el calentamiento global y debido a que el sector ganadero representa una fuente importante de emisiones de gases de efecto invernadero (GEI), hace que se incluya la evaluación de las emisiones de CH₄ de este. El objetivo del presente estudio fue evaluar en vacas lecheras el efecto de sustitución parcial de ración totalmente mezclada (RTM) por alfalfa fresca sobre el ambiente ruminal y las emisiones de metano (CH₄). Se utilizaron 12 vacas en un diseño crossover con dos períodos experimentales, asignadas a dos tratamientos (6 vacas/tratamiento): T100: 100% RTM, y T60: 60% RTM y alfalfa fresca a voluntad. El estudio tuvo una duración de 58 días, con dos períodos de adaptación de 21 días y 8 días de mediciones cada uno. La RTM fue preparada semanalmente y al momento de la alimentación fue agregado silo de pastura como fuente de forraje de la RTM. En ambos tratamientos, la RTM fue suministrada en comederos individuales, mientras que en T60 la alfalfa fresca fue pastoreada en forma directa en parcelas individuales. El consumo de nutrientes fue estimado por la diferencia entre lo ofrecido y lo rechazado. Los últimos dos días de cada período de medición se tomaron muestras de contenido ruminal utilizando sonda esofágica en dos momentos distintos relativos a la oferta de alimento (4 h posterior a la primera oferta de RTM del día y 4 h posterior al ingreso a la pastura de T60). Las emisiones de CH₄ se registraron durante 5 días utilizando la técnica SF₆ para mediciones prolongadas en ambos períodos experimentales. Todos los resultados fueron evaluados a través de análisis de varianza utilizando el procedimiento mixto de SAS. El consumo de materia seca, materia orgánica, fibra neutro detergente, fibra ácido detergente y proteína bruta fue menor en T60 con respecto a T100 (P < 0,001). Se observó una interacción tratamiento x período para propiónico, butírico y NH₃ ruminal a las 4 h de la primera oferta de alimento del día (P < 0,05), sin diferencias entre tratamientos ni entre períodos. Hubo interacción tratamiento x periodo en las muestras de contenido ruminal tomadas 4h posterior al ingreso de la pastura de T60 (P < 0,05), con diferencias entre tratamientos para pH (P = 0,01) y ácido butírico (P = 0,03). Únicamente se observaron diferencias entre tratamientos en las emisiones de CH₄ expresadas como g/kg de materia seca consumida (P = 0,03). En base a los resultados obtenidos en el presente estudio, podemos establecer que la sustitución de un 40% de RTM por alfalfa fresca en vacas lecheras permitió obtener un ambiente ruminal similar al de vacas alimentadas únicamente con RTM, sin incrementar las emisiones de CH₄ ni afectar negativamente la producción de leche.

SUMMARY

The intensification of dairy production has generated new feeding strategies such as the use of total mixed rations (TMR) with or without access to grazing, in order to improve feeding costs and the nutraceutical properties of milk. On the other hand, the growing interest in global warming and the fact that the livestock sector represents an important source of greenhouse gas (GHG) emissions, has led to the evaluation of methane (CH₄) emissions from this sector. The aim of the present study was to evaluate in dairy cows the effect of partial replacement of the (TMR) with fresh alfalfa on rumen environment and CH₄ emissions. Twelve cows were used in a crossover design with two experimental periods, assigned to two treatments (6 cows/treatment): T100: 100% TMR and T60: 60% TMR and freely fresh alfalfa. The study lasted 58 days with two adaptation periods of 21 days and 8 days of measurements each. TMR was prepared weekly and at the time of feeding pasture silage was added as a source of TMR forage. In both treatments, TMR was provided in individuals fed bunkers while fresh alfalfa was grazed directly in individual parcels at T60. Nutrient intake was estimated by the difference between what was offered and what was rejected. On the last two days of each measurement period samples of ruminal content were taken using an esophageal probe at two different times relative to feed offering (4 hours after the first TMR offering of the day and 4 hours after entering the T60 pasture). CH₄ emissions were recorded for 5 days using the SF₆ technique for prolonged measurements in both experimental periods. All results were evaluated by analysis of variance using the mixed procedure of SAS. Intake of dry matter, organic matter, neutral detergent fiber, acid detergent fiber and raw protein were lower in T60 than in T100 ($P < 0.001$). A treatment \times period interaction was observed for propionic, butyric, and ruminal NH₃ at 4 h after the first feed offering of the day ($P < 0.05$), with no differences between treatments or between periods. There was a treatment \times period interaction in rumen content samples taken 4 hours after T60 pasture intake ($P < 0.05$), with differences between treatments for pH ($P = 0.01$) and butyric acid ($P = 0.03$). Differences between treatments were only observed in CH₄ emissions expressed as g/kg dry matter consumed ($P = 0.03$). Only differences between treatments were observed in CH₄ emissions expressed as g/kg dry matter consumed ($P=0.03$). Based on the results obtained in the present study, we can establish that the substitution of 40% TMR for fresh alfalfa in dairy cows allowed for obtaining a rumen environment similar to that of cows fed only with TMR, without increasing CH₄ emissions or negatively affecting milk production.

1. INTRODUCCIÓN

La producción lechera en Uruguay se sustenta principalmente sobre sistemas pastoriles debido a las condiciones climáticas y edáficas que favorecen la producción y el aprovechamiento de las pasturas en forma directa todo el año. La inclusión de pasturas de alta calidad representa una proporción importante de la dieta en estos sistemas, lo que es considerado a nivel internacional como un factor determinante para la mejor relación costo/beneficio (Dillon, 2006; Soder y Muller, 2007). A su vez, el consumo de pastura fresca en la dieta de vacas lecheras determina una mejor calidad nutricional del producto final, lo que favorece la salud humana debido al perfil de ácidos grasos en la leche (Kelley, Hubbard y Erickson, 2007).

Una alternativa a los sistemas pastoriles, son los sistemas que utilizan raciones totalmente mezcladas (RTM). En estos sistemas se suministran los concentrados y forrajes completamente mezclados en una ración única. Esto permite ofrecer la dieta con una buena relación forraje concentrado aumentando el consumo de materia seca (MS) y la producción, con mínima posibilidad de selección de los componentes individuales de la RTM (Pastorini, 2016; Soder y Muller, 2007). Sin embargo, estos sistemas de producción en confinamiento no permiten el acceso al forraje fresco, lo que es una limitante para sistemas basados en el pastoreo, como los sistemas lecheros de nuestro país.

Como estrategia para alcanzar los altos niveles productivos obtenidos en los sistemas RTM y los beneficios de la inclusión de pasturas frescas, desde hace varios años se viene trabajando en la combinación de pastura y RTM, denominadas raciones parcialmente mezcladas (RPM), debido a que la pastura fresca no es parte integral de la RTM, sino que se suministra aparte (Bargo, Muller, Delahoy y Cassidy, 2002a). Algunos estudios recientes indican que la utilización de una RPM permitiría alcanzar o incluso superar tanto el consumo, como la producción de leche logrados por vacas que consumen solamente RTM (Mendoza, 2016; Vibart, Fellner, Burns, Huntington y Green, 2008). Sin embargo, aún no están claros los niveles de pastura fresca que pueden ser incluidos en las dietas RPM que permitirían lograr los beneficios de las pasturas sin afectar la producción de leche respecto a sistemas confinados con RTM.

Por otro lado, además de la evaluación productiva de las diferentes estrategias nutricionales en vacas lecheras, desde hace varios años hay un interés creciente en generar datos nacionales vinculados a las emisiones de metano entérico en vacas alimentadas con diferentes estrategias nutricionales. En este sentido, Uruguay para el año 2019 reportó emisiones totales netas de GEI de 0,03% a nivel mundial, de las cuales la mayor producción provino de la fermentación entérica que se les atribuye a los bovinos (Ministerio de Ambiente (MA) y Sistema Nacional de Respuesta al Cambio Climático (SNRCC), 2021).

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

En la última década la producción lechera en nuestro país experimentó una serie de cambios desde el punto de vista de la producción. Se vio un incremento en la producción lechera, pero con un descenso en el área destinada a dicho rubro debido a la competencia con otras actividades agropecuarias, acompañado de una disminución del número de productores y de cabezas de ganado (Aguerre et al., 2017; Couto et al., 2021). Estos datos reflejan la alta productividad individual del rodeo lechero del país, así como la intensificación del rubro.

El crecimiento productivo se vio reflejado en una mayor producción por hectárea, ya que según el Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca (2015), este suceso se logró con una mayor carga animal por hectárea y con un aumento en la suplementación (reserva forrajera y concentrado). De todos modos, los tambos uruguayos siguen teniendo una fuerte influencia en el uso pastoril, ya que según Chilbroste et al. (2014) la pastura conforma entre el 48% al 54% de la dieta de los animales, parámetro que es muy importante debido a que las pasturas utilizadas correctamente son el alimento más económico (Dillon, 2006).

Uruguay es el séptimo exportador de productos lácteos a nivel mundial, exportando el 70% de lo producido, pero debido a que el volumen exportado es muy pequeño a nivel mundial, nuestro país es tomador de precios lo que obliga al sector a incrementar la producción por unidad de superficie (Giudice, Artagaveytia, Baraibar, Rostán y Pedemonte, 2021).

2.1. Estrategias nutricionales para vacas lecheras

En la siguiente sección se analizan diferentes estrategias nutricionales utilizadas en los sistemas de producción lechera (Sistemas pastoriles, sistemas que utilizan RTM y la combinación de ambas).

2.1.1 Sistemas pastoriles

La alimentación con base pastoril en vacas lecheras está muy extendida en distintos países como Nueva Zelanda, Australia, Argentina, Chile, Irlanda y Uruguay, entre otros. Generalmente, se trata de países que presentan ventajas climáticas que les permite la producción sobre pasturas durante gran parte del año. Estos sistemas se basan en la recolección de pastura por parte del bovino como principal componente de la dieta. Los principales beneficios de estos sistemas están relacionados al bienestar animal, en contraposición con los sistemas de confinamiento (Rushen, De Passillé, Keyserlingk y Weary, 2008). A la vez que presentan ventajas comparativas relacionadas a un menor costo relativo respecto a otros insumos como los forrajes conservados o los concentrados (Dillon, 2006).

Diferentes estudios han reportado que el uso de forrajes en estado vegetativo temprano lograría cubrir una gran parte de los requerimientos nutricionales necesarios para obtener altas producciones. Sin embargo, un estado vegetativo avanzado podría limitar el aporte de nutrientes necesarios para cubrir los requerimientos energéticos.

Esta variabilidad en la calidad de la pastura es una de las grandes limitantes de estos sistemas, sobre todo vinculado al efecto sobre el consumo de MS (Rebuffo, Risso y Restaino, 2000). La suplementación con concentrados ha sido una herramienta muy utilizada por los sistemas pastoriles, para alcanzar los requerimientos que permitan explotar completamente el potencial genético de los animales (Kolver, 2003). Las limitantes sobre el consumo se deben principalmente a restricciones físicas (digestión y pasaje de material por el tracto digestivo), tiempo invertido en traslado de los animales, búsqueda del alimento, recolección, tiempo de rumia y en muchos casos el alto contenido de agua de la pastura que hace muy poco eficiente la cosecha de MS de cada bocado (Chilibroste et al., 2014; Dillon, 2006). Otra particularidad, es el efecto de la selectividad animal durante el pastoreo, a diferencia de dietas RTM donde se logra disminuir este factor (Kolver y Muller, 1998; Kolver, 2003).

A pesar de las limitantes mencionadas, las pasturas son la base de los sistemas de producción de leche de nuestro país y la región, debido principalmente a la mejor relación costo/beneficio. A su vez, la leche producida en sistemas pastoriles presenta un producto final de mejor calidad nutracéutica para el consumo humano (mejores niveles de ácido linoleico conjugado), tanto en la leche como en la carne (Aurousseau et al., 2007; Lourenço, Van Ranst, Vlaeminck, De Smet y Fievez, 2008). De todos modos, los sistemas pastoriles con o sin suplemento son altamente vulnerables a distintos factores ambientales y de manejo, por lo que resulta relevante avanzar en estrategias que permitan potenciar el consumo de pasturas sin afectar el nivel productivo.

2.1.2 Sistemas de ración totalmente mezclada (RTM)

Los sistemas de alimentación basados en RTM son ampliamente usados y recomendados por países del hemisferio norte, principalmente en países donde las condiciones climáticas no permiten la cosecha de la pastura en forma directa por los animales durante gran parte del año (Cajarville, Mendoza, Santana y Repetto, 2012; Mendoza, 2016; Soder y Muller, 2007). En este sistema, los alimentos concentrados y forrajes son ofrecidos a los animales completamente mezclados en una única ración (Pastorini, 2016).

La oferta de la dieta de manera más precisa es una de las principales ventajas de este sistema, debido a que baja la posibilidad de selección de los alimentos, obteniendo más control del balance de los nutrientes, con una óptima relación forraje/ concentrado (Mendoza, 2016). A su vez, el consumo de MS total en dietas RTM sería mayor con respecto a dietas que incluyen forraje fresco (Bargo, Muller, Kolver y Delahoy, 2003; Bargo et al., 2002a; Chilibroste, 2012; Mendoza, 2016). En instancias tempranas de lactancia donde se ha visto que el consumo de alimento por animal es bajo con respecto a los niveles de energía requeridos, la utilización de estos sistemas es de gran ayuda debido a que las RTM permiten aportar en pequeños volúmenes gran cantidad de proteína y energía (Chilibroste, 2012).

Desde el punto de vista de los productores el uso de RTM puede traer aparejadas desventajas económicas a corto y mediano plazo. Esto es debido a que para

implementar este sistema se necesita una importante inversión inicial en infraestructura y maquinaria, y a largo plazo implica mayor costo en mano de obra capacitada (Civiero et al., 2021; Soriano, Polan y Miller, 2001). A su vez, la tendencia a un mayor consumo de granos en la población, sumado a la elaboración de biocombustibles está disminuyendo la disponibilidad de los granos para la alimentación de los animales. Esto genera una fuerte competencia en los precios de mercado a los que el productor debe enfrentarse. En lo que refiere al bienestar animal estos sistemas están bastante cuestionados, no solo por el confinamiento que implica, sino que sanitariamente se ha reportado mayor incidencia en casos de mastitis y problemas podales (Charlton, Rutter, East y Sinclair, 2011).

2.1.3 Sistemas que combinan RTM y pastura fresca

En los últimos años ha surgido un notable interés por incluir pasturas en la dieta de vacas lecheras, a través de la incorporación de sistemas de alimentación de RPM como alternativa a los sistemas de alimentación anteriormente mencionados (Soder y Muller, 2007). Esta combinación de RTM y pastura fresca busca potenciar las ventajas de los dos sistemas, obteniendo altas producciones con un producto final de buena calidad nutraceútica y con menor riesgo económico.

A nivel internacional, se reportan varios trabajos evaluando el uso de RPM en comparación con otras estrategias (Bargo, et al., 2002a; Bargo, Muller, Varga, Delahoy y Cassidy, 2002b). En este sentido, Bargo et al. (2002a) observaron que las vacas alimentadas con RTM produjeron mayor cantidad de leche, grasa y proteína, asociado a un mayor consumo de energía, mientras que la dieta de pastura con concentrado produjo menos, siendo el tratamiento RPM en el que se obtuvieron resultados intermedios. Por otra parte, Vibart et al., (2008) reportaron que con un aumento en la proporción de raigrás anual (21% a 41%) en estado vegetativo en una dieta de tipo RTM no se vio afectada la producción de vacas lecheras. Caso contrario ocurrió con la misma pastura, pero en un estado más avanzado de madurez y con menor calidad, el aumento de su proporción de 11% a 35% redujo el consumo total de MS, la producción de leche y proteína. Por su parte, Morales et al., (2010) compararon el uso de una dieta RTM con distintos tiempos de acceso a una pastura de gramíneas y leguminosas, concluyendo que el consumo de pastura aumentó y el de RTM disminuyó a mayor tiempo de acceso a la pastura, no habiendo diferencias en consumo total de MS entre tratamientos.

A nivel nacional se viene investigando estos sistemas con el fin de explotar su potencialidad productiva en nuestro país, buscando niveles productivos similares a los obtenidos en vacas alimentadas únicamente con RTM, pero maximizando la inclusión de pastura (Aguerre et al., 2017; Chilibroste, 2012; Mendoza, 2016; Pastorini, 2016; Pomiés, 2014). Estos autores en sus respectivos experimentos utilizaron al menos 3 tratamientos, teniendo una alimentación 100% RTM, otro grupo alimentado con dietas RPM (pastura y RTM, con diferentes proporciones y/u horarios) y un tercer grupo alimentado con pastura y en algunos casos suplementados con concentrado. Los resultados reportados indicaron que el consumo de MS fue mayor en las vacas alimentadas únicamente con RTM, seguidas por aquellas alimentadas con dietas

RPM. En cambio, la producción de leche fue menor en las vacas con mayor proporción de pastura en contraposición con las alimentadas únicamente con RTM. En este sentido, el nivel de inclusión de pastura, parecería ser el desafío planteado, ya que se ha observado que niveles de incorporación de pastura del 50% en vacas de alta producción presentaron repercusiones negativas sobre la producción láctea. Sin embargo, niveles de incorporación de 30% mostraron resultados positivos (Pastorini, Pomiés, Repetto, Mendoza y Cajarville, 2019).

2.2. Ambiente ruminal

El estudio del ambiente ruminal en vacas lecheras resulta relevante para comprender como se ve afectada la fermentación ruminal al evaluar diferentes estrategias nutricionales.

2.2.1 pH

Uno de los parámetros estudiados con el fin de comprender la fermentación es el pH ruminal, puesto que afecta los diferentes procesos microbianos, entre ellos la fermentación. El rango fisiológico oscila entre 5,5 a 7,0. Su valor depende de factores como el alimento suministrado, tamaño de partícula, cantidad y tipo de carbohidratos, frecuencia y nivel de ingesta alimenticia (Cerrato, Calsamiglia y Ferret, 2005). El pH óptimo para las arqueas (microorganismos productores de CH₄) es 6,5 a 7,0. Estos microorganismos son muy sensibles a cambios en el medio ruminal, especialmente pH (De Blas et al., 2008), y están relacionados con la producción de acetato, proceso en el que de forma secundaria se genera CO₂, precursor de la formación de CH₄.

Existen diferentes mecanismos fisiológicos que participan en la regulación del pH ruminal. Entre ellos, la producción y absorción de ácidos grasos volátiles (AGV), la producción de saliva, la cual es rica en bicarbonato de sodio que funciona como tampón, y el tamaño de la partícula del alimento (Salado, 2020). Cuando los procesos fisiológicos de regulación fallan, el medio ruminal se acidifica, pudiendo producir una acidosis ruminal aguda, esto se da con una disminución importante en el pH ruminal (pH < 5) principalmente causado por la ingesta de carbohidratos de rápida fermentación (Krause y Oetzel, 2006). Por otra parte, si el pH ruminal se mantiene por largos períodos en rangos bajos (5 a 5,5) se puede producir acidosis subaguda (SARA por su sigla en inglés), con motilidad intestinal reducida, ulceración ruminal, laminitis y abscesos hepáticos (Kronqvist, Petters, Robertsson y Lindberg, 2021).

Bargo et al., (2002b) reportaron valores promedio de $5,87 \pm 0,04$ para vacas lecheras alimentadas con dietas RTM, RPM o pasturas con suplementación, sin diferencias entre tratamientos. Los autores destacan que, a pesar de las diferentes dietas ofrecidas, los resultados podrían estar relacionados a la baja relación forraje/concentrado en el tratamiento con RTM y el consumo limitado de fibra y la alta digestibilidad ruminal de las pasturas en los tratamientos con suplementación y RPM, incluso con una alta relación forraje/concentrado (Bargo, et al., 2002b). A nivel nacional, Mendoza, (2016) reportó un menor valor de pH en animales que tenían un

menor consumo de forraje y un mayor consumo de RTM con respecto a animales que presentaban mayor proporción de pastura en la dieta. Estas diferencias fueron atribuidas a que los primeros presentaron un incremento del aporte de energía fermentable a nivel ruminal, lo que habría llevado a una mayor producción de AGV total. Por su parte, Pastorini, (2016) y Pomiés, (2014) no observaron diferencias de pH (promedio $6,06 \pm 0,04$) entre vacas alimentadas con diferentes proporciones de forraje fresco de alta calidad combinado con RTM. Si bien los resultados son variables, una de las principales ventajas del uso de RTM radicaría en las menores variaciones de pH ruminal en comparación con la alimentación separada de forrajes y concentrados (Schingoethe, 2017).

2.2.2 Ácidos Grasos Volátiles (AGV).

La fermentación de alimentos en el rumen produce AGV de cadena corta, principalmente acético, propiónico y butírico, así como también CO_2 , CH_4 , NH_3 , y en ocasiones ácido láctico. Los AGV son la principal fuente de energía, absorbida por la pared ruminal de donde obtienen los rumiantes la energía necesaria para sus funciones vitales, ya que el alimento que ingresa al aparato digestivo no está directamente disponible para ser utilizado por el animal (Contreras y Noro, 2010).

Según Kozloski, (2011), la concentración total de AGV en el líquido ruminal normalmente varía entre 60 mmol/L y 160 mmol/L. La composición de la dieta puede modificar la población microbiana del rumen y consecuentemente influir sobre la producción de AGV (Salado, 2020). Por un lado, la suplementación con carbohidratos de fácil fermentación (ejemplo: almidón) tiende a aumentar la producción de propionato y reducir la de acetato, de manera opuestas los carbohidratos fibrosos como pueden ser la celulosa y la hemicelulosa resultan en una producción proporcionalmente mayor de ácido acético y butírico (Bargo et al., 2003; Mendoza, 2016). Si bien la fermentación de carbohidratos no fibrosos es energéticamente más eficiente que la fermentación de los carbohidratos fibrosos, los primeros tienen una mayor proporción de AGV. Trabajos nacionales realizados por los Departamentos de Bovinos y de Nutrición Animal de Facultad de Veterinaria, en donde se emplearon bovinos y ovinos alimentados con pasturas de alta calidad, reportaron altos niveles de AGV a nivel ruminal (Aguerre et al., 2009; Aguerre, Cajaraville, Kozloski y Repetto, 2013). Si bien la producción de AGV total no se modifica mayormente, el perfil de AGV en rumen se altera, disminuyendo la relación acético/propiónico debido a las variaciones en la composición de la dieta (Bargo, et al., 2002b).

La dieta tiene efectos directos sobre la proporción de AGV producidos en el rumen, la cual modifica la composición de la leche. Se menciona en la bibliografía que dietas con alto contenido de almidón elevan el contenido de proteína y volumen de la leche (Bargo et al., 2003; Salado, 2020), probablemente relacionado a una mayor disponibilidad de propionato ruminal (el principal precursor glucogénico) y la producción de proteína microbiana que da como resultado una mayor disponibilidad de aminoácidos en el intestino delgado (Rigout, Hurtaud, Lemoscjuet, Bach y Ruquin, 2003). El contenido de grasa en la leche se ve relacionado con la proporción de FND de la dieta debido a que influye en el pH ruminal y en la concentración de acetato,

principal precursor de los ácidos grasos sintetizados en la glándula mamaria (Kellaway y Harrington, 2004).

2.2.3 Nitrógeno amoniacal (NH₃)

El NH₃ es uno de los principales productos de la fermentación ruminal asociado principalmente a la degradabilidad de las proteínas de la dieta, siendo uno de los principales insumos para la síntesis de proteína microbiana. El NH₃ que no es utilizado por los microorganismos ruminales es absorbido por el epitelio ruminal e ingresado a la circulación portal hacia el hígado, donde es transformado en urea, metabolito principal de excreción del NH₃. Un porcentaje es excretado por orina y leche, mientras que el restante retorna al retículo-rumen por medio de la saliva o por difusión directa a través de las paredes de los pre-estómagos (Kozloski, 2011). La urea producida a nivel hepático se equilibra rápidamente a través de los fluidos corporales, incluyendo la leche, la concentración de urea en esta es considerada un reflejo de la concentración de urea en sangre. Tener control sobre los niveles de urea eliminados es de suma importancia debido a que el exceso de proteína bruta consumido incrementa las necesidades de energía (Bonilla, Noboa, Portuguez, Quinto y Rojas, 2020). A su vez, los suplementos proteicos son los insumos más costosos y el exceso de excreción de N tiene un impacto negativo en el ambiente (National Research Council y Subcommittee on Dairy Cattle Nutrition (NRC), 2000).

En rumiantes alimentados con forraje proveniente de pasturas templadas como las que se encuentran en nuestra región, ya sean praderas mezclas de gramíneas y leguminosas o verdeos, son reportadas altas concentraciones de NH₃ ruminal, asociado al alto contenido de proteína de estas pasturas (Cajarville, Aguerre y Repetto, 2006; Capelesso, 2020; Salado et al., 2017). Lograr maximizar el uso del NH₃ ruminal proveniente de la fermentación de estas pasturas es uno de los desafíos más complejos, sobre todo por la dificultad a la hora de la sincronización de nutrientes (oferta de energía y proteína a nivel ruminal). En este sentido, la utilización de la proteína degradable en rumen podría mejorarse a través de un mayor consumo de concentrado energético. En el experimento realizado por Van Vuuren y Van Den Pol-Van Dasselaar, (2006), se observó que cada 25 gr de N/kg de materia orgánica fermentada se optimiza la eficiencia en la utilización de NH₃; esto se puede asociar a una reducción de la producción NH₃ ruminal o al aumento de la absorción microbiana a nivel ruminal (Almeida et al., 2020).

Uno de los potenciales beneficios de la combinación de pasturas frescas con RTM, estaría vinculado a una mejor sincronización de nutrientes a nivel ruminal, permitiendo bajar las concentraciones de NH₃ ruminal (Bargo, et al., 2002b; Salado et al., 2017).

2.3. Metano (CH₄) en rumiantes

Debido a la creciente preocupación de los países industrializados por el calentamiento global, nace a partir de esto el concepto de Huella de carbono, el cual es un indicador objetivo que mide las emisiones de GEI, identifica vías de control o reducción de estas

y estima sus impactos (Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), 2022). Las emisiones de GEI producidas por Uruguay superan el promedio per cápita a nivel mundial, siendo menor al de los países industrializados, y presenta como particularidad que el mayor porcentaje de lo producido proviene del sector agropecuario (MA y SNRCC, 2021). La fermentación entérica ocupa un papel fundamental en las emisiones totales del país, lo que implica que el sector agropecuario en su conjunto esté bajo escrutinio por motivos ambientales. En vista de lo anterior, se necesita con urgencia la identificación de estrategias efectivas de mitigación de CH₄ que no comprometan el desempeño animal (Congio et al., 2021).

La posible implementación de alternativas para lograr disminuir las emisiones de CH₄ entérico requieren de un claro conocimiento y entendimiento del proceso de formación del mismo. El CH₄ es uno de los productos finales de la fermentación microbiana formado por Arqueas quienes poseen la capacidad de reducir el CO₂ usando H₂ como única fuente de energía, con la formación de CH₄ y H₂O (Clark, Kelliher y Pinares, 2011; Vlaming, López, Brookes, Hoskin y Clark, 2008). Las Arqueas son anaerobias estrictas, muy sensibles a cambios en el medio ruminal, especialmente pH, siendo su rango óptimo de 6,5 a 7,0 (De Blas, García, Cambara y Torres, 2008). Estos microorganismos están asociadas a la producción de acético, donde se libera CO₂, necesario para la formación de CH₄ (Martin, Morgavi y Doreau, 2010). El CH₄ no es utilizado por el animal y es eliminado en mayor proporción por eructos o por exhalación junto con otros gases producidos en el rumen. La metanogénesis y la eliminación de los gases son un componente esencial en el rumen ya que permite mantener el pH ruminal en condiciones estables para la actividad microbológica (Clark et al., 2011; Martin et al., 2010). De este modo, la importancia de la metanogénesis radica en que, la formación de CH₄ es la principal vía para la remoción del H₂ generado en la fermentación ruminal (Martin et al., 2010). Por ello, cualquier intento de modificar la producción de CH₄ ruminal debe tener en cuenta la forma alternativa de remoción del H₂ (Clark et al., 2011). Cuando las pasturas son predominantemente a base de gramíneas se da una mayor pérdida de energía bruta ingerida como CH₄ con relación a la obtenida en predominio de leguminosas, ya que, las gramíneas proporcionan mayores niveles de fibra que estimulan la rumia, menor tasa de pasaje y mayor tasa de fermentación, con altos niveles de acético e H₂, todo lo cual afecta la metanogénesis (Waghorn y Woodward, 2006).

Además de las diferencias entre forrajes, existen otros factores de la dieta, como determinantes de la emisión de CH₄, entre ellos, la composición química y la digestibilidad. En relación con la composición química Pinares, Baumont y Martin, (2003) reportaron una alta correlación entre la producción de CH₄ y la FND ingerida. Este efecto de la FND digestible ingerida radica en que esta es una medida del consumo de carbohidratos estructurales digestibles. Esto se debe a que la FND se compone de celulosa, hemicelulosa y lignina, por lo que, si alguno de estos componentes aumenta, el tiempo de digestión se verá retrasado, lo que lleva un mayor tiempo de contacto entre los microorganismos y el alimento, prolongando el proceso de rumia.

La calidad del forraje, el manejo y el procesamiento de estos podría usarse como posibles herramientas de mitigación de CH₄, debido a que se vio una correlación

directa entre mayor calidad y digestibilidad de los nutrientes y una menor producción de CH₄ (Hristov et al., 2013). Para esto se debe tener en cuenta el manejo del pastoreo, el cual se debe realizar cuando las pasturas alcanzan la madurez óptima. A su vez, experimentos donde se combinaron pasturas templadas de alta calidad con RTM, han demostrado que la producción de CH₄ (g/kg de CMS) puede ser menor en las vacas lecheras que pastan exclusivamente pasturas de alta calidad en comparación con vacas que reciben una dieta exclusiva de RTM (O'Neill et al., 2011b). A su vez, en un nuevo estudio realizado por O'Neill et al., (2012), donde se midió la intensidad de CH₄ (g/kg de CMS), este no cambió en vacas que pastoreaban exclusivamente pasturas templadas o que recibían RTM combinada con pastura fresca, explicado por la similitud entre la calidad del forraje y la RTM.

Por otra parte, el PV de los animales es un factor determinante en la producción diaria de CH₄, expresada como g/d. Esto estaría relacionado con que el PV podría afectar el CMS llevando esto a una alteración en la tasa de pasaje del alimento, lo que conduciría a diferencias en la digestibilidad del alimento y la producción de AGV, afectando la producción de CH₄. Por lo tanto, los animales más pequeños, con menor requerimiento energético de mantenimiento, ingieren menos alimento y tienen menor producción de CH₄ (Dini, 2012; Hristov et al., 2013; Moraes, Strathe, Fadel, Casper y Kebreab, 2014).

Si bien existen trabajos nacionales que evaluaron diferentes niveles de inclusión de pastura sobre el ambiente ruminal y la producción de leche (Pomiés, 2014; Mendoza, 2016; Pastorini, 2016) cabe señalar que en ningún caso reportaron resultados vinculados a las emisiones de metano.

3. HIPÓTESIS

La sustitución parcial de RTM por alfalfa fresca en las dietas de vacas lecheras promueve un ambiente ruminal más estable en cuanto a las variaciones de pH, concentraciones de AGV y NH_3 , manteniendo la producción y sin incrementar las emisiones de metano con respecto a vacas alimentadas únicamente con RTM.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general:

Evaluar en vacas lecheras el efecto de sustituir RTM por pastura fresca sobre el ambiente ruminal y las emisiones de metano.

4.2. Objetivos específicos:

Cuantificar el impacto de la sustitución parcial de RTM por alfalfa fresca sobre:

1. El pH ruminal, las concentraciones de AGV y amoniaco ruminal.
2. Las emisiones de metano

5. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio se realizó en el Instituto de Producción Animal de la Facultad de Veterinaria (bb) y en las instalaciones del Campo Experimental N°2 ubicado en Ruta 1, km 42,5, San José, Uruguay (34° S y 55° O), durante los meses de noviembre, diciembre y enero (2021-2022).

Los análisis de CH₄ fueron realizados en el laboratorio del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), La Estanzuela ubicado en el Departamento de Colonia sobre la Ruta 50, Km 11.

Todos los procedimientos con animales se realizaron bajo la aprobación de la Comisión de ética en el Uso de Animales (CEUA-FVET - Protocolo CHEA Experimento N° 111900-000364-18).

5.1. Animales, diseño experimental y alimentos

Se utilizaron 12 vacas (peso promedio de $545 \pm 67,2$ Kg) de 150 días en leche (DEL). Las vacas fueron seleccionadas en primera instancia por los Kg de leche producidos (24,75 Lt, % grasa 4,09 y % proteína 3,12 en promedio), con un mínimo de 7000 kg de leche en la lactancia previa. Posteriormente se hizo una segunda selección a partir del número de lactancias ($4,42 \pm 1,44$), DEL (150 ± 37 días) y fecha de parto (9/6/2021 ± 37 días). Finalmente, fueron seleccionadas 10 vacas Holstein, 1 Jersey y la restante cruce Holstein x Jersey.

Se utilizó un diseño experimental crossover, el cual consistió en el cruzamiento de los tratamientos posterior al primer período de medición. Luego de 21 días de acostumbramiento a la dieta y al manejo se llevó a cabo el primer período de muestreo con una duración de 8 días.

Los tratamientos experimentales fueron:

- T100: 100% RTM.
- T60: 60% RTM y alfalfa fresca a voluntad.

Para el ensayo las vacas seleccionadas fueron distribuidas al azar a uno de los dos tratamientos (3 vacas de más 150 DEL y 3 de menos de 150 DEL). Además, había 2 vacas que superaban los 600 Kg de PV a las cuales se les asignó un grupo diferente, con el objetivo de tener un plantel comparativamente homogéneo, quedando una en T60 y la otra en T100.

La RTM fue formulada para producir 30 Lt según el programa NRC (2001) considerando el peso promedio de los animales y en el caso de los animales más pesados la oferta fue ajustada según el PV (682 Kg/PV y 616 Kg/PV). La RTM estaba conformada en un 79,5% por silo de pradera, 15,34% de grano húmedo de maíz, 4,13% de harina de soja, 0,24% de bicarbonato de sodio, 0,78% de Premezcla vitamínico-mineral y un 0,007% de Rumensin.

La RTM fue suministrada en comederos individuales, a excepción de la cascarilla de soja que fue suministrada al momento del ordeño. En T60, la RTM fue ofrecida al 60% del consumo estimado para cada vaca. La alfalfa fresca fue ofrecida ad libitum mediante pastoreo directo en parcelas individuales, considerando el consumo estimado según NRC (2001) (consumo estimado 16 Kg/MS, oferta 19 Kg de MS/d/Vaca).

La composición química de la alfalfa fresca, de la RTM y de los ingredientes utilizados para formular la RTM se presenta en la Tabla 1.

Tabla 1. Composición química de la alfalfa fresca, de la RTM y de los ingredientes utilizados en los dos períodos experimentales.

	Alfalfa fresca		RTM		Ingredientes de la RTM (valores promedio entre periodos)			
	P1	P2	P1	P2	CS	SP	GM	HS
MS (% MF)	26,2 ± 1,5	30,9 ± 2,9	43,2 ± 1,82	45,6 ± 2,54	90,2 ± 1,06	37,9 ± 3,04	91,6 ± 0,36	91,4 ± 0,64
Nutrientes (% MS)								
MO	86,6 ± 3,8	85,4 ± 8,6	91,1 ± 0,2	91,5 ± 1,0	94,8 ± 0,7	90,1 ± 1,3	98,4 ± 0,2	93,4 ± 0,1
PC	15,4 ± 2,8	15,9 ± 1,6	12,1 ± 0,4	13,4 ± 1,4	12,6 ± 1,4	10,5 ± 0,5	8,70 ± 0,6	48,6 ± 0,7
FND	45,9 ± 7,3	46,7 ± 5,6	53,9 ± 0,9	43,4 ± 3,9	62,2 ± 2,3	48,4 ± 1,7	12,0 ± 3,5	13,2 ± 2,4
FAD	18,1 ± 2,0	15,9 ± 1,0	18,5 ± 0,8	14,3 ± 2,7	22,4 ± 0,4	18,4 ± 0,3	2,06 ± 0,6	4,84 ± 0,7
CNF	-	-	22,9 ± 0,5	32,0 ± 1,9	20,2 ± 2,3	29,0 ± 1,0	74,6 ± 1,1	29,1 ± 0,9
Extracto etéreo	-	-	2,3 ± 0,2	2,7 ± 0,3	1,54 ± 0,3	2,29 ± 0,1	3,89 ± 0,4	1,90 ± 0,2
NIDN	0,33	0,44	0,13	0,18	-	-	-	-
NIDA	5,15	4,09	0,48	2,92	-	-	-	-

P1: período 1; P2: período 2; CS: cascarilla de soja; SP: silo de pastura; GM: grano de maíz; HS: harina de soja.

5.1.1 Manejo de los animales y de la alimentación

La oferta de RTM en las vacas de T100 se realizó dos veces por día (60% del total en la mañana y 40% en la tarde). Al grupo T60 se les ofrecía solamente en el turno de la mañana y en la tarde pastoreaban.

La RTM fue ofrecida a cada vaca en comederos individuales ubicados en cada corral. Durante el período de adaptación T60 pastoreó en parcela única, mientras que durante el período de muestreo se realizaron parcelas individuales (cada día una nueva parcela).

En ambos sitios (corrales y parcela) se disponía de agua fresca a voluntad. Durante el período de mediciones los grupos se manejaban de manera individual, luego de concurrir al ordeño de la mañana entre las 5:00 a 6:00 h T100 y T60 eran arreadas a los corrales individuales donde a las 7:00 h se les ofrecía el 60% de la RTM de la dieta total. Posteriormente volvían al ordeño a las 16:00 h, donde T100 regresaba a los corrales y se les volvía a administrar RTM a las 18:00 h, mientras que las vacas de T60 eran trasladadas a la pastura.

La preparación de la RTM se realizaba en dos partes, la primera era la creación de una premezcla y luego se le incorporaba el silo. La premezcla se hacía una vez por semana y se mezclaban 142 Kg de harina de soja, 530 Kg de maíz, 0,252 Kg de Rumensin, 8,4 Kg de bicarbonato de sodio y 26,88 Kg de premezcla vitamínico-mineral.

Para la elaboración de las parcelas se recorría el potrero atravesándolo de forma diagonal recolectando forraje fresco en diez puntos distintos utilizando un cuadrado de 0,1 m², para calcular la disponibilidad de materia seca (Fariña, Tuñón, Pla y Martínez, 2017). De esta manera, se determinaba la conformación de las diferentes parcelas, buscando ofrecer en cada una de ellas 19 Kg/MS. La misma fue determinada todos los días en microondas (hasta peso constante). Para el segundo período fue necesario instalar un sistema de riego, debido a la sequía que se presentó por esos días de manera de asegurar la oferta de alfalfa fresca en el segundo período.

5.2. Determinaciones (período de mediciones)

El primer período de mediciones transcurrió desde el 6 al 13 de diciembre del 2021, mientras que el segundo período fue del 5 al 12 de enero del 2022.

5.2.1 Consumo de nutrientes

El consumo de RTM y de alfalfa se evaluó individualmente durante 5 días por oferta y rechazo. Diariamente se pesaron, registraron y tomaron muestras de los alimentos ofrecidos (pool) y rechazados de forma individual. Se tomaba muestra de rechazo cuando este superaba el 10% de lo ofrecido. Las muestras obtenidas fueron almacenadas en freezer (-4°C) para su posterior análisis. Para los análisis químicos las mismas eran secadas parcialmente en estufa de aire forzado a 60° durante 48

horas, molidas a un tamaño de malla de 1 mm con el uso de un molino (Fritsch GmbH, Idar-Oberstein, Birkenfeld, Alemania) y almacenadas en recipientes individuales.

5.2.2 Parámetros Ruminales

Para la determinación de los parámetros de fermentación ruminal (pH, AGV y NH_3), las muestras de líquido ruminal fueron extraídas los dos últimos días de cada período de medición por sonda esofágica con el uso de bomba de vacío. Los primeros muestreos se realizaron 4 hs luego de la comida principal (11:00hs), mientras que los segundos fueron realizados 4 hs posterior a que las vacas T60 ingresaran a la pastura (23:00 hs). Luego de extraída la muestra se registraba el pH medido con pH metro digital (eChem Instruments Pte., Oakton, Singapore), descartando la primera muestra. Se extrajo muestra por duplicado (0.5 ml de líquido ruminal) para posterior análisis de AGV utilizando como conservante 0.5 ml de ácido perclórico (concentración 0.1M). A su vez, se extrajo muestra en duplicado (1 mL de líquido ruminal) para NH_3 , utilizando como conservante 0.5 ml de ácido sulfúrico (concentración 50/50 v/v). Las muestras de AGV y NH_3 fueron conservadas a -4°C en freezer.

5.2.3 Emisiones de metano entérico

Las emisiones de metano entérico en las vacas fueron registradas utilizando la técnica del trazador Hexafluoruro de azufre (SF_6) para períodos de medición prolongados, según protocolo propuesto por Johnson y Johnson (1995) y adaptada posteriormente por Gere, (2012) para períodos prolongados (Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, 2015).

La preparación de todos los implementos y puesta en condiciones de medición de los diferentes accesorios necesarios fue realizada en INIA – La Estanzuela. Antes del comienzo del primer período de mediciones, el 02/12/2021, a cada animal se le suministró, utilizando un lanza bolos, un tubo de permeación relleno del gas marcador hexafluoruro de azufre (SF_6). Estos tubos fueron previamente calibrados durante cinco semanas en “baño maría” a 37°C para poder determinar su tasa de liberación de SF_6 . El día anterior al inicio de la colecta de CH_4 entérico, se colocaron dos cilindros recolectores a cada vaca ubicándolos en el lomo del animal, utilizando arneses y “mochilas” diseñados para este propósito (Figura 1). Estos cilindros fueron previamente limpiados con nitrógeno, llevados a condiciones de vacío, y ajustados para la colecta de aire para 5 días. Además, se incluyeron tres tubos recolectores para la colecta de CH_4 ambiental. La emisión de CH_4 entérico se determinó durante dos períodos independientes de cinco días. Una vez finalizado cada período de medición, los cilindros fueron trasladados nuevamente hacia INIA – La Estanzuela en donde se les midió y registró la presión. Aquellos tubos que permanecieron sobre el animal durante todo el período de medición y presentaron una presión en el rango de 400 a 600 mbar fueron consideradas como válidas. A cada tubo recolector válido, se le extrajeron cuatro submuestras en viales de 6 mL. Estas submuestras fueron analizadas utilizando un cromatógrafo de gases (Agilent 7890 – A) equipado con un

detector FID y un metanizador para la determinación del CH₄ y un detector uECD para la determinación del SF₆.

Para el cálculo de la emisión diaria de CH₄ entérico (g/d) se utilizó una ecuación que incluyó, la tasa de liberación de SF₆ de cada tubo de permeación, los valores de concentración de CH₄ (ppm) y de SF₆ (ppt) de cada submuestra, la corrección de las concentraciones de CH₄ y SF₆ entéricos (CH₄ ent y SF₆ ent) de las submuestras colectadas de los animales y las concentraciones del recipiente control (CH₄ atm y SF₆ atm) y la corrección por los pesos moleculares de cada gas (PM CH₄ = 16 y PM SF₆ = 146):

$$\text{CH}_4(\text{g/día}^{-1}) = \text{SF}_6_{\text{TL}} (\text{mg/día}^{-1}) * \left[\frac{\text{CH}_4_{\text{ent}} - \text{CH}_4_{\text{atm}} (\text{ppm})}{\text{SF}_6_{\text{ent}} - \text{SF}_6_{\text{atm}} (\text{ppt})} \right] * \left[\frac{16 (\text{PM CH}_4)}{146 (\text{PM SF}_6)} \right] * 1000$$



Figura 1: Vacas con dispositivos recolectores de metano

5.3. Análisis químicos

Las muestras de RTM y alfalfa, tanto ofrecidas (pool) como rechazadas fueron analizadas para: MS (Método ID 934.01), MO (Método ID 942.05), EE (Método Goldfisch-Nielsen, 2003) y PB; mediante el método Kjeldahl N x 6,25; (Método ID 954.01) de acuerdo con el AOAC (2000). La FND y FAD se determinaron de acuerdo con Robertson y Van Soest (1981) y expresadas excluyendo las cenizas residuales según Mertens (2003), la FND se analizó usando α -amilasa, sin sulfito de sodio. A las ofertas de alimento, a los componentes de la RTM y a la cascarilla de soja se analizó

el NIDN y NIDA, determinados por análisis de nitrógeno de los respectivos residuos. Los CNF fueron calculados como $CNF=100 - (FND(g/100g)) + PB (g/100g) + EE (g/100g)$, de acuerdo con Sniffen et al. (1992).

La concentración de AGV (ácidos acéticos, propiónico, y butírico) se determinó por cromatografía líquida de alta performance (HPLC), según Adams et al. (1984). Se usó un equipo HPLC (Dionex Ultimate® 3000, Waltham, MA, USA), usando una columna Acclaim, C18, 5 μ m, con una columna 4,5 x 250 mm ajustada a 205 nm. Para esta se utilizaron muestras obtenidas a la hora 11:00 y 23:00. La concentración total de AGV se calculó como la suma de las concentraciones de ácidos acético, propiónico y butírico. Para la determinación de NH_3 , las muestras se descongelaron a temperatura ambiente, se centrifugaron (10.000 \times g durante 15 min a 4°C) y se analizaron utilizando un espectrómetro (BEL Photonics®, S-2000, SP, Brasil) ajustado a 625 nm según la técnica propuesta por Weatherburn (1967).

5.4. Análisis estadísticos

Los datos fueron analizados a través de un análisis de varianza usando el procedimiento MIXED de SAS (9.0; SAS Institute, Cary, NC, EEUU).

Para consumo de nutrientes, pH, las concentraciones de AGV, NH_3 , producción de leche y las emisiones de metano el modelo utilizado fue:

$$Y_{ijk} = \mu + D_i + P_k + (D \times P) + e_{ij}$$

donde, Y_{ij} es la variable dependiente, μ es la media general, D_i es el efecto del tipo de tratamiento (dieta) ($i = 100\%RTM$ ó $60\%RTM$) en j réplicas de animales ($n = 6$ vacas/tratamiento), P es el efecto del periodo ($k = 1$ ó 2), $D \times P$ es la interacción entre la dieta y el periodo y e_{ij} es el error residual.

Fueron consideradas diferencias significativas valores de $P \leq 0,05$ y valores de P entre 0,05 y 0,10 se consideraron como tendencias a diferencia

6. RESULTADOS

Los resultados de consumo de MS son presentados en la Tabla 2. Se observó una interacción T*P en el consumo total de MS ($P = 0,035$), con un menor consumo de MS en las vacas T60 con respecto a T100 ($P < 0,001$). A su vez, el consumo de MS total fue mayor en P2 con respecto al P1 ($P < 0,001$).

En P2, el consumo de RTM fue mayor con respecto al P1 para ambos tratamientos ($P = 0,001$), al igual que el consumo de pastura en T60 ($P < 0,001$).

La cascarilla de soja fue suministrada al momento del ordeño a una cantidad fija, sin registros de rechazo.

Tabla 2. Consumo de materia seca (Kg/d) en vacas lecheras alimentadas con una dieta 100% RTM (T100) o 60% RTM + alfalfa a voluntad (T60).

Ítems	Tratamiento				EEM	<i>P-valor</i>		
	T100		T60			T	P	T*P
	P1	P2	P1	P2				
RTM	15,1	16,3	9,31	9,96	0,222	<0,001	0,001	0,147
CS	5,37	5,37	5,37	5,37	-	-	-	-
Alfalfa	-	-	2,58	4,12	0,085	-	<0,001	-
Total	20,5	21,7	17,3	19,5	0,240	<0,001	<0,001	0,035

¹ T100 = 100% RTM; T60 = 60% RTM más 40% alfalfa fresca.

² T = efecto de tratamiento;

³ T = efecto del tratamiento; P = efecto del período; T*P = interacción T x P.

En la Tabla 3 se presentan los resultados de consumo de nutrientes por tratamiento y por período experimental. El consumo de MO fue menor para T60 con respecto a T100 ($P < 0,001$), con un mayor consumo de MO en P2 con respecto a P1 ($P < 0,001$).

Se observó una interacción T*P ($P = 0,05$) para el consumo de FND, FAD y PC ($P < 0,05$). El consumo de FND, FAD y PC fue menor en las vacas T60 con respecto a T100 ($P < 0,001$), con un mayor consumo en P2 con respecto a P1 ($P < 0,001$).

Tabla 3. Consumo de nutrientes (Kg MS/d) de vacas lecheras alimentadas con una dieta 100% RTM (T100) o 60% RTM + alfalfa a voluntad (T60).

Ítems	T100		T60		EEM	<i>P- valor</i>		
	P1	P2	P1	P2		T	P	T*P
MO	18,9	20,0	15,8	17,8	0,218	<0,001	<0,001	0,051
FND	10,7	11,3	9,13	10,2	0,117	<0,001	<0,001	0,034
FAD	3,74	3,95	3,21	3,58	0,040	<0,001	<0,001	0,032
PC	2,61	2,77	2,26	2,58	0,032	<0,001	<0,001	0,007

¹ T100 = 100% RTM; T60 = 60% RTM más 40% alfalfa fresca.

² P1 = Período 1: 6 al 13/12/2021; P2 = Período 2: 5 al 12/1/2022

³ T = efecto del tratamiento; P = efecto del período; T*P = interacción T x P.

⁴ MO = materia orgánica; FND = fibra neutro detergente; FAD = fibra ácido detergente; PC = Proteína cruda.

En la tabla 4 se presentan los resultados de pH, AGV y NH₃ ruminal registrados 4 h luego de la primera oferta de RTM del día. El pH no presentó diferencias significativas entre tratamientos ni entre períodos. Con respecto a la concentración de acético, no se observaron diferencias entre tratamientos, ni períodos.

Se observó una interacción T*P para las concentraciones de Propiónico y Butírico, y la relación A:P (P < 0,01), sin diferencias entre tratamientos ni períodos. No se observan diferencias entre tratamientos ni períodos para la concentración de NH₃ ruminal.

Tabla 4. pH ruminal, AGV (mmol/L), proporción de acético, propiónico y butírico, y concentración de NH₃ (mg/dl) en vacas lecheras alimentadas con 100% RTM (T100) o 60% RTM + alfalfa a voluntad (T60) 4 h luego de la primera oferta de RTM del día.

Ítems	Tratamientos ^{1,2}				EEM	<i>P- valor</i> ³		
	T100		T60			T	P	T x P
	P1	P2	P1	P2				
pH	6,38	6,32	6,42	6,34	0,095	0,938	0,443	0,775
AGV	36,7	32,1	33,9	39,4	1,74	0,238	0,750	0,010
Acético	66,8	65,1	67,1	65,9	0,798	0,482	0,077	0,759
Propiónico	21,2	19,9	18,8	20,8	0,372	0,055	0,316	0,002
Butírico	12,0	15,0	14,1	13,3	0,623	0,769	0,092	0,006
A:P ⁴	3,16	3,27	3,59	3,17	0,097	0,108	0,119	0,013
NH ₃	10,3	12,5	10,6	10,4	0,865	0,363	0,291	0,209

¹ T100 = 100% RTM; T60 = 60% RTM más 40% alfalfa fresca.

² P1 = Período 1: 6 al 13/12/2021; P2 = Período 2: 5 al 12/1/2022

³ T = efecto del tratamiento; P = efecto del período; T*P = interacción T x P.

⁴ Relación Acético:Propiónico.

En la Tabla 5 se presentan los resultados de pH, AGV y NH₃ ruminales registrados 4 h luego de la segunda oferta de alimento del día, en el caso de T60 del ingreso a la pastura.

Se observó una interacción T*P para el pH ruminal (P = 0,010). Las vacas alimentadas con T60 presentaron un mayor pH ruminal con respecto a T100 (P < 0,012), sin diferencias entre períodos experimentales.

Hubo interacción T*P para las concentraciones ruminales de Acético, Propiónico y Butírico, y la relación A:P (P < 0,05). Únicamente la concentración de butírico presentó diferencias entre tratamientos (P = 0,028).

Se observó una interacción T*P (P = 0,028) para la concentración de NH₃ ruminal. No se observaron diferencias significativas entre tratamientos, ni períodos.

Tabla 5. pH ruminal, AGV (mmol/L), proporción de acético, propiónico y butírico y concentración de NH₃ (mg/dl) en vacas lecheras alimentadas con 100% RTM (T100) o 60% RTM + alfalfa a voluntad (T60) 4 h luego de la oferta de alfalfa fresca en T60.

Ítems	Tratamientos ^{1,2}				EEM	<i>P-valor</i> ³		
	T100		T60			T	P	T × P
	P1	P2	P1	P2				
pH	6,11	6,34	6,52	6,33	0,079	0,012	0,777	0,010
AGV	44,5	44,3	41,2	42,3	2,62	0,344	0,855	0,777
Acético	69,5	71,0	70,0	68,5	0,492	0,163	0,968	0,036
Propiónico	20,0	19,5	19,6	19,6	0,390	0,055	0,316	0,002
Butírico	10,5	9,39	10,4	11,8	0,471	0,028	0,716	0,017
A:P ⁴	3,47	3,64	3,60	3,50	0,097	0,906	0,743	0,018
NH ₃	8,97	12,1	12,1	10,6	0,986	0,500	0,516	0,076

¹ T100 = 100% RTM; T60 = 60% RTM más 40% alfalfa fresca.

² P1 = Período 1: 6 al 13/12/2021; P2 = Período 2: 5 al 12/1/2022

³ T = efecto del tratamiento; P = efecto del período; T*P = interacción T × P.

⁴ Relación Acético:Propiónico.

En la Tabla 6 se presentan los resultados de las emisiones de metano por tratamiento y por períodos experimentales. No se observaron diferencias entre tratamientos ni entre período en las emisiones de CH₄ en g/d.

Las vacas T60 emitieron mayores cantidades de metano en relación con el consumo de MS (P = 0,031), sin diferencias entre períodos experimentales. Mientras que no se observaron diferencias en las emisiones de CH₄ con relación a la producción de leche (g/kg), ni en relación con los kg de grasa y proteína en leche.

Con respecto a la producción y composición de leche podemos observar que la producción diaria fue mayor en ambos períodos para el grupo T60 respecto a T100, valores que no se acompañan con los resultados estadísticos expresados en la tabla (P= 0,199; T=0,189).

Tabla 6. Emisiones de metano y producción de leche en vacas lecheras alimentadas con 100% RTM (T100) o 60% RTM + alfalfa a voluntad (T60).

Ítems	Tratamientos ^{1,2}				EEM	Valor-P ³		
	T100		T60			T	P	T x P
	P1	P2	P1	P2				
gCH ₄ /d	535	512	513	533	32,2	0,949	0,996	0,524
gCH ₄ /kg MS	26,1	23,7	29,9	27,2	1,66	0,031	0,114	0,949
gCH ₄ /kg FDN	50,1	45,5	56,5	52,2	3,19	0,041	0,153	0,955
gCH ₄ /kg de leche	20,8	23,8	20,4	20,8	2,01	0,444	0,317	0,439
gCH ₄ /kg de 4%LCG ⁴	19,9	23,1	20,7	19,8	1,62	0,398	0,453	0,188
gCH ₄ /kg grasa láctea	492	575	525	480	39,8	0,412	0,620	0,104
gCH ₄ /kg PC en leche	601	673	638	598	52,5	0,752	0,697	0,266
Leche kg/d	25,6	22,7	26,0	25,6	1,25	0,189	0,199	0,333
4% LCG	26,5	22,7	25,8	26,9	0,790	0,981	0,188	0,023
Grasa, %	4,25	4,14	4,09	4,36	0,179	0,884	0,604	0,278
Proteína, %	3,42	3,52	3,31	3,50	0,098	0,475	0,135	0,623

¹ T100 = 100% RTM; T60 = 60% RTM más 40% alfalfa fresca.

² P1 = Período 1: 6 al 13/12/2021; P2 = Período 2: 5 al 12/1/2022

³ T = efecto del tratamiento; P = efecto del periodo; T*P = interacción T x P.

La 4% LCG no presentó diferencias significativas entre tratamientos y período al igual que el resto de los componentes (grasa, proteína y lactosa).

Las emisiones de CH₄ por animal (12 vacas) mostraron cierta asociación con el PV siendo que los animales pesados tuvieron, en general, mayores niveles de CH₄ (Figura 2).

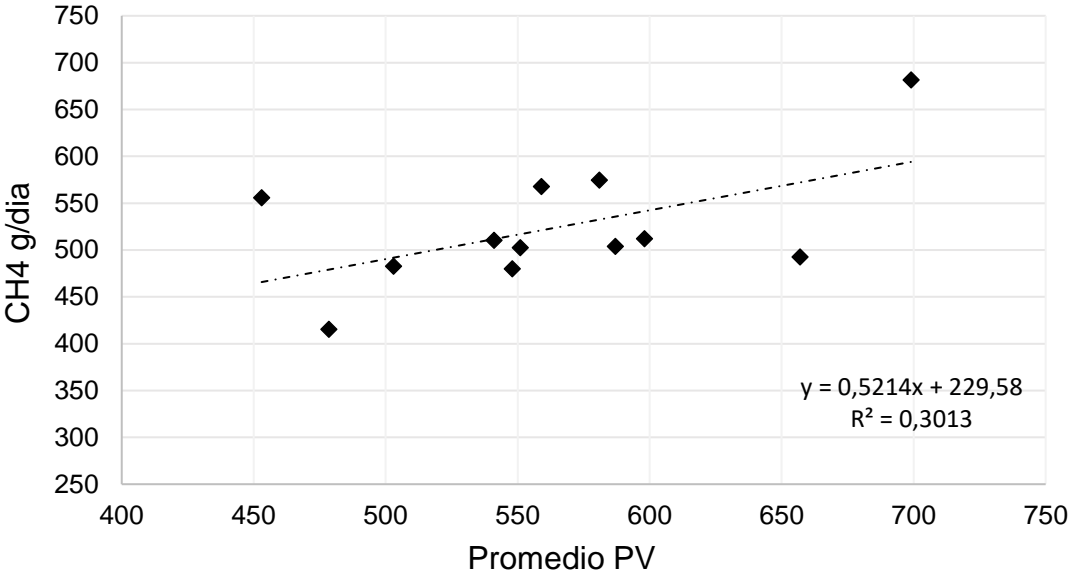


Figura 2. Emisiones de CH₄ en función del peso vivo.

7. DISCUSIÓN

Las vacas T60 consumieron un 13% menos de MS con respecto a las T100. Este resultado reflejó una de las principales limitantes de la producción lechera en los sistemas pastoriles, vinculada al bajo consumo de materia seca en relación con otras estrategias, como por ej. RTM (Cajarville et al., 2012). Resultados similares, fueron reportados por Pomiés, (2014), la cual indicó que una mayor inclusión de pastura fresca en la dieta se tradujo en un menor consumo de MS (24,7 vs. 22,9 kg MS/día). Las diferencias observadas en nuestro experimento se pueden atribuir al porcentaje de MS que presentaba la pastura con respecto a la RTM, puesto que la pastura presentaba un mayor contenido de agua, lo que podría contribuir al llenado ruminal y a su vez impactar en una baja eficiencia en la cosecha de MS por cada bocado. A su vez, el tamaño de partícula que presentaron los diferentes alimentos podría haber influido debido a que la alfalfa presentó un mayor tamaño de partícula, lo que pudo provocar un mayor nivel de saciedad con una menor cantidad de MS (Araujo, 2005). Por su parte, las diferencias en el consumo observadas entre los períodos experimentales podrían ser atribuidas a la calidad de la pastura. En P1 la alfalfa se encontraba en estado reproductivo, mientras que en P2 se encontraba en estado vegetativo. A su vez, cabe recordar que en P2 se incluyó riego de las parcelas. Es sabido que la calidad de la pastura repercute directamente en el consumo. En el caso de la alfalfa, según datos reportados por Rebuffo et al., (2000) alfalfas en estado reproductivo limitan el consumo frente a las mismas en estado vegetativo. Esto quedó evidenciado en los resultados del presente trabajo, al observar las diferencias de consumo de pastura entre P1 y P2, ya que en este último los animales consumieron un 37% más de pastura.

En lo que refiere al consumo de nutrientes, tal y como se puede observar en la Tabla 3, el mayor consumo de MO para ambos tratamientos se dio en P2 con respecto al mismo tratamiento en P1, lo que se explicaría por el mayor consumo de MS en el segundo período de medición. Resultados similares se observaron para FND, FAD y PC, donde se observó un menor consumo en T60 con respecto a T100 en ambos períodos. Al observar T60 se evidenció una clara diferencia entre períodos, esto se puede asociar a un mayor consumo de MS en P2 en comparación a P1, además, se podría relacionar con la calidad del forraje, mayor contenido de MS y menor contenido de FAD. Resultados similares obtuvieron Mendoza, (2016), y Pastorini, (2016), quienes reportaron un menor consumo de nutrientes a medida que aumentaba el consumo de forraje.

La diferencia observada en la composición química de la RTM entre periodos podría estar relacionada a la variación de la composición química del silo de pastura. En el segundo periodo el silo fue proveniente de una nueva bolsa de reserva, que presentó diferencias en su composición química y en su calidad. Esta variación podría explicar las diferencias observadas además en la concentración de NIDA, posiblemente relacionadas a diferencias en la calidad de fermentación de la reserva.

En cuanto al ambiente ruminal, el pH durante los dos períodos fue mayor en T60 con respecto a T100 posterior al ingreso de la pastura. Esto se podría relacionar con las características de las dietas pastoriles que promueven la rumia y mantienen valores de pH más cercanos a la neutralidad, debido a que la FND que aporta la pastura estimula una mayor producción de saliva y con ella la presencia de sustancias tampón (Allen, 1997). A su vez, las dietas RTM poseen altos contenidos de almidón y fibras fermentables que están asociados a mayores niveles de AGV, lo que podría estar explicando los menores valores de pH de T100 con respecto a T60. Los valores registrados en el presente estudio son similares a los reportados por Pomiés, (2014) al comparar tres tratamientos (100% RTM, 75% RTM con 25% pastura y 50% RTM con 50% pastura). Sin embargo, fueron más elevados con respecto a los valores de 5,87 reportados por Bargo, et al., (2002b). Posiblemente, estas diferencias se deban a los diversos niveles de inclusión de pasturas utilizados.

Los resultados obtenidos con respecto a la proporción de AGV en el primer horario de muestreo podrían explicarse por el hecho de que los animales en ese momento estaban consumiendo exactamente el mismo alimento y en las mismas proporciones, lo que sustenta la falta de diferencias entre tratamientos. Las diferencias observadas en proporción de ácido butírico entre los tratamientos podrían deberse a que al final de la producción de un determinado ácido por los m.o el mismo puede ser utilizado como sustrato de otro m.o, sobre todo el ácido acético que al ser utilizado como sustrato forma butírico (40% a 80% es formado de esta manera). Entonces puede haber un aumento de producción de butírico porque hay un aumento previo de la producción de acético, el cual está muy relacionado con el consumo de pasturas, de todas formas, no presenta diferencias significativas, esto se pudo deber a que el mismo se esté usando como sustrato por parte de las bacterias para formar Butírico (Zavaleta, S.F.).

En el caso del NH_3 no se observaron diferencias significativas, pero se detectaron variaciones numéricas pequeñas entre períodos y en el momento de toma de muestra para cada uno de los tratamientos. En el caso de T60 se ve un pequeño aumento luego de que ingresaron a pastoreo y en T100 una leve disminución en el mismo horario de muestreo. En el caso del aumento en T60 se pudo dar porque las pasturas templadas poseen la particularidad de generar altas concentraciones de NH_3 debido a su alta contenido de proteína, pero en general, no contienen la suficiente energía como para aprovechar todo ese NH_3 producido (Cajarville et al., 2012). La falta de suficientes carbohidratos en la pastura, que permitan una correcta sincronía entre la cantidad de carbohidratos y la degradación de proteína, genera un aumento de NH_3 ruminal (Salado, 2020). Si tomamos como referencia lo reportado por Van Vurren y Van Den Pol-Van Dasselaar, (2006), los cuales establecieron un valor mínimo de NH_3 de 8 mg/dl, por debajo del cual se comprometería la síntesis de proteína microbiana, en nuestro experimento las concentraciones superaron los valores mínimos en todos los tratamientos. En este sentido, cabe destacar que, en el presente estudio, las muestras de contenido ruminal se extrajeron por sonda esofágica y no por cánula ruminal. Esto podría ser un factor para tener en cuenta, sobre todo por posible contaminación de la muestra con saliva que altere los valores de concentración de NH_3 (De Assis Lage et al., 2020).

En cuanto a la producción de leche comparando con en el consumo de nutrientes, cabe resaltar que no se vio afectada por la inclusión de pastura fresca en la dieta. Este resultado resalta la capacidad de esta estrategia de alimentación para obtener las ventajas de la inclusión de pastura sin afectar la producción.

Con respecto a las emisiones de CH₄ entérico, los valores registrados fueron elevados. Si bien la literatura a nivel nacional es escasa en cuanto a los estudios de emisiones de CH₄, comparando los resultados con los obtenidos por Dini, (2012) y Loza, (2017), los valores del presente estudio fueron mayores promediando 524 g/d, mientras que Dini reportó 368 g/d y Loza 363 g/d. En el presente estudio la eficiencia de recolección fue alta, con respecto a los valores reportados en otros experimentos. Por ejemplo, Dini, (2012) reportó baja eficiencia de recolección con tan solo el 52 % de los tubos con un rango previsto de muestra acumulada (400 mbar y 600 mbar). No hubo diferencias en las emisiones de CH₄ entre tratamientos, ni períodos, aunque estadísticamente no se puede adjudicar un efecto de período, el mismo grupo de vacas fue el que tuvo mayor producción de CH₄ independientemente del tratamiento que se le asignó. A partir de estos resultados, podría especularse que el PV y el consumo de algunas de las vacas podría tener un efecto sobre el nivel de emisión de CH₄. Algunos autores destacan el efecto individuo, mencionando que cada animal puede emitir ciertos niveles de CH₄, porque existe una relación entre el consumo de MS y el PV sobre la producción de CH₄, debido a que los animales más pequeños presentarían una mayor tasa de pasaje por una mayor relación entre el consumo de MS y PV del animal (Congio et al., 2021; Hristov et al., 2013; Niu et al., 2018).

Por su parte, cuando comparamos la producción de CH₄ por unidad de alimento ingerido se evidenció una mayor emisión para los animales T60 en ambos períodos con respecto a T100, vinculado al menor consumo de MS obtenido por T60. Diversos autores destacan que las pasturas en comparación con las RTM presentan un mayor poder metanogénico (Harper, Denmead, Freney y Byers, 1999), lo que concuerda con la recopilación de datos realizada en América Latina y el Caribe que establecen que con el aumento de la proporción de forraje, aumenta la concentración de FND en la dieta lo que conduce a una mayor producción de acetato y butirato, lo que resulta en un aumento del H₂ ruminal y, en consecuencia, una mayor producción de CH₄ (Congio et al., 2022). En este sentido, en P2 T60 presentó una menor producción por unidad de alimento ingerido que en P1, lo cual podría estar relacionado con una mejor calidad del forraje. Estos resultados coinciden con lo reportado por Hristov et al., (2013) quienes concluyeron que el consumo de pasturas templadas de alta calidad no aumentaría las emisiones de CH₄. En base a lo anteriormente mencionado el presente estudio reportó emisiones de CH₄ de 26,7 g/kg MS en promedio, siendo un 5,93% y 5,61% superiores a las obtenidas por Dini, (2012); y Loza, (2017), respectivamente.

En cuanto a la emisión de CH₄ por Kg de leche producida se obtuvo 21,5 g/kg de leche siendo 4,1% superior a lo reportado por Dini y 3,96% reportado por Loza (Dini, 2012; Loza, 2017). Al comparar T100 con respecto a lo reportado por O'Neill et al., (2011a), en cuanto a las emisiones de CH₄ en g/día/vaca se vio un 24,4% más de emisión en el presente estudio, y al contrastar las emisiones en g/Kg MS ingerida este estudio también reportó un 5,1% más, lo que se puede atribuir a un mayor consumo de MS.

En definitiva, el éxito en los resultados de consumo, ambiente ruminal y emisiones de metano de estrategias que combinan pastura fresca con RTM, parecería estar ligado a la calidad de la pastura, además de la proporción de pastura en la dieta.

8. CONCLUSIÓN

La sustitución parcial de RTM por alfalfa fresca en vacas lecheras mostró un ambiente ruminal similar al de vacas alimentadas únicamente con RTM, sin afectar la producción de leche, ni las emisiones de CH₄.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguerre, M., Cajarville, C., La Manna, A., Cavestany, D., Mendoza, A., Mattiauda, D. A., ... Chilibroste, P. (2017). *Estrategias de alimentación de vacas lecheras en pastoreo: ¿qué hemos aprendido de los sistemas comerciales y qué hemos generado desde la investigación en Uruguay?*. Montevideo: ANII, UDELAR, CONAPROLE, INIA, CRI, INIALE. Recuperado de <http://www.inia.uy/Publicaciones/Paginas/publicacionAINFO-57907.aspx>
- Aguerre, M., Cajarville, C., Kozloski, G. V., y Repetto, J. L. (2013). Intake and digestive responses by ruminants fed fresh temperate pasture supplemented with increased levels of sorghum grain: A comparison between cattle and sheep. *Animal Feed Science and Technology*, 186(1-2), 12-19. <https://doi.org/10.1016/J.ANIFEEEDSCI.2013.08.007>
- Aguerre, M., Cajarville, C., Machado, V., Persak, G., Bambillasca, S., y Repetto, J. L. (2009). Dry matter intake and digestibility of temperate pastures supplemented with sorghum grain in wethers and heifers. *South African Journal of Animal Science*, 39(1), 251-255. <https://doi.org/10.4314/sajas.v39i1.61158>
- Allen, M. S. (1997). Relationship between Fermentation Acid Production in the Rumen and the Requirement for Physically Effective Fiber. *Journal of Dairy Science*, 80(7), 1447-1462. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(97\)76074-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(97)76074-0)
- Almeida, J. G. R., Dall-Orsoletta, A. C., Oziembowski, M. M., Michelon, G. M., Bayer, C., Edouard, N., y Ribeiro-Filho, H. M. N. (2020). Carbohydrate-rich supplements can improve nitrogen use efficiency and mitigate nitrogenous gas emissions from the excreta of dairy cows grazing temperate grass. *Animal*, 14(6), 1184-1195. <https://doi.org/10.1017/S1751731119003057>
- Araujo, O. (2005). Factores que afectan el consumo voluntario en bovinos a pastoreo en condiciones tropicales. En *IX Seminario de pastos y Forrajes* (pp.1-12). San Cristóbal: Universidad Nacional Experimental del Táchira.
- Arousseau, B., Bauchart, D., Faure, X., Galot, A. L., Prache, S., Micol, D., y Priolo, A. (2007). Indoor fattening of lambs raised on pasture. Part 1: Influence of stall finishing duration on lipid classes and fatty acids in the longissimus thoracis muscle. *Meat Science*, 76(2), 241-252. <https://doi.org/10.1016/J.MEATSCI.2006.11.005>
- Bargo, F., Muller, L. D., Delahoy, J. E., y Cassidy, T. W. (2002a). Performance of high producing dairy cows with three different feeding systems combining pasture and total mixed rations. *Journal of Dairy Science*, 85(11), 2948-2963. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(02\)74381-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(02)74381-6)
- Bargo, F., Muller, L. D., Delahoy, J. E., y Cassidy, T. W. (2002b). Milk Response to Concentrate Supplementation of High Producing Dairy Cows Grazing at Two Pasture Allowances. *Journal of Dairy Science*, 85(7), 1777-1792. [https://doi.org/10.3168/JDS.S0022-0302\(02\)74252-5](https://doi.org/10.3168/JDS.S0022-0302(02)74252-5)

- Bargo, F., Muller, L. D., Kolver, E. S., y Delahoy, J. E. (2003). Invited Review: Production and digestion of supplemented dairy cows on pasture. *Journal of Dairy Science*, 86(1), 1-42. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73581-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73581-4)
- Bargo, F., Muller, L. D., Varga, G. A., Delahoy, J., y Cassidy, T. W. (2002). Ruminant digestion and fermentation of high-producing dairy cows with three different feeding systems combining pasture and total mixed rations. *Journal of Dairy Science*, 85(11), 2964-2973. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(02\)74382-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(02)74382-8)
- Bonilla, D. J., Noboa, L., Portuguez, V., Quinto, F., y Rojas, J. J. (2020). Metanogénesis microbiana en animales poligástricos. *Nutrición Animal Tropical*, 14(1), 36-49. <https://doi.org/10.15517/nat.v14i1.42578>
- Cajarville, C., Aguerre, M., y Repetto, J. L. (2006). Rumen pH, NH₃-N concentration and forage degradation kinetics of cows grazing temperate pastures and supplemented with different sources of grain. *Animal Research*, 55(6), 511-520. <https://doi.org/10.1051/animres:2006036>
- Cajarville, C., Mendoza, A., Santana, A., y Repetto, J. L. (2012). En tiempos de intensificación productiva... ¿cuánto avanzamos en el conocimiento de los nuevos sistemas de alimentación de la vaca lechera?. *Veterinaria (Montevideo)* 48(1), 35-39. Recuperado de <http://www.ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/11770/1/AUPA-2012-35-39-Cajarville.pdf>
- Capelesso, A. S. (2020). *Alimentación de vacas lecheras en pastoreo: Factores que impactan en la eficiencia del uso de los alimentos* (Tesis de Doctorado). Facultad de Veterinaria, UDELAR, Montevideo.
- Cerrato, M., Calsamiglia, S. y Ferret, A. (2005). Efectos del tiempo a pH subóptimo sobre la fermentación microbiana ruminal en cultivo continuo. En Gobierno de Aragón, Servicio de Investigación Agroalimentaria (Ed.), *XI Jornadas sobre Producción Animal*, (Vol. I y II, pp.623-625). Zaragoza: Gobierno de Aragón.
- Charlton, G. L., Rutter, S. M., East, M., y Sinclair, L. A. (2011). Effects of providing total mixed rations indoors and on pasture on the behavior of lactating dairy cattle and their preference to be indoors or on pasture. *Journal of Dairy Science*, 94(8), 3875-3884. <https://doi.org/10.3168/JDS.2011-4172>
- Chilibroste, P. (2012). Estrategias de alimentación en sistemas de producción de leche de base pastoril. *Cangüe*, (32), 2-8.
- Chilibroste, P., Battegazzore, G., Caorsi, L., Bachetta, C., Bidegain, M. J., Ciliu-Tti, J., ... Lema, E. (2014). *Proyecto Producción Competitiva*. Montevideo: CONAPROLE.
- Civiero, M., Delagarde, R., Berndt, A., Rosseto, J., de Souza, M. N., Schaitz, L. H., y Ribeiro-Filho, H. M. N. (2021). Progressive inclusion of pearl millet herbage as a supplement for dairy cows fed mixed rations: Effects on methane emissions, dry matter intake, and milk production. *Journal of Dairy Science*, 104(3), 2956-2965. <https://doi.org/10.3168/JDS.2020-18894>

- Clark, H., Kelliher, F., y Pinares-Patino, C. (2011). Reducing CH₄ emissions from grazing ruminants in New Zealand: Challenges and opportunities. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 24(2), 295-302.
<https://doi.org/10.5713/ajas.2011.r.04>
- Congio, G. F. de S., Bannink, A., Mayorga Mogollón, O. L., Jaurena, G., Gonda, H., Gere, J. I., ... Hristov, A. N. (2021). Enteric methane mitigation strategies for ruminant livestock systems in the Latin America and Caribbean region: A meta-analysis. *Journal of Cleaner Production*, 312, 127693.
<https://doi.org/10.1016/J.JCLEPRO.2021.127693>
- Congio, G. F. S., Bannink, A., Mayorga, O. L., Rodrigues, J. P. P., Bougouin, A., Kebreab, E., ... Hristov, A. N. (2022). Prediction of enteric methane production and yield in dairy cattle using a Latin America and Caribbean database. *Science of The Total Environment*, 825, 153982.
<https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2022.153982>
- Contreras, P. A., y Noro, M. (2010). *Rumen: morfofisiología, trastornos y modulación de la actividad fermentativa* (3ª ed.). Valdivia: Imprenta América.
<https://doi.org/10.13140/2.1.2686.4326>
- Couto, P., Freiría, G., Fontán, M. V., Ortíz, A., Fernández, J., Rostan, F., y Bianchi, M. (2021). *Estadísticas del sector lácteo*. Recuperado de <https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/diea>
- De Assis Lage, C. F., Räisänen, S. E., Melgar, A., Nedelkov, K., Chen, X., Oh, J., ... Hristov, A. N. (2020). Comparison of Two Sampling Techniques for Evaluating Ruminant Fermentation and Microbiota in the Planktonic Phase of Rumen Digesta in Dairy Cows. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1-11.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.618032>
- De Blas, C., García-Rebollar, P., Cambra-López, M., y Torres, A. G. (2008). Contribución de los rumiantes a las emisiones de gases con efecto invernadero. En *XXIV Curso de especialización FEDNA* (pp. 121-150). Madrid: FEDNA.
- Dillon, P. (2006). Achieving high dry-matter intake from pasture with grazing dairy cows. En A. Elgersma, J. Dijkstra, y S. Tamminga (Eds.), *Fresh Herbage for Dairy Cattle: the Key to a Sustainable Food Chain* (pp. 1-26). Amsterdam: Springer.
- Dini, Y. (2012). *Emisión de metano entérico de vacas lecheras en pastoreo de praderas dominadas por gramíneas o por leguminosas* (Tesis de Maestría). Facultad de Agronomía, UDELAR, Montevideo.
- Fariña, S., Tuñón, G., Pla, M., y Martínez, R. (2017). *Sistema de Pastoreo La Estanzuela: Guía práctica para la implementación de un sistema de pastoreo*. Montevideo: INIA.
- Gere, J. (2012). *La técnica de trazado por SF₆ para medir emisiones de metano de rumiantes en pastoreo. Desarrollos metodológicos y algunas aplicaciones* (Tesis doctoral). Facultad de Ciencias Exactas, UNCPBA, Tandil.

- Giudice, G., Artagaveytia, J., Baraibar, M., Rostán, F., y Pedemonte, A. (2021). *Escenarios para la lechería uruguaya 2021/2022. Mercados, producción, precios y costos*. Montevideo: INALE.
- Harper, L. A., Denmead, O. T., Freney, J. R., y Byers, F. M. (1999). Direct measurements of methane emissions from grazing and feedlot cattle. *Journal of Animal Science*, 77(6), 1392-1401. <https://doi.org/10.2527/1999.7761392X>
- Hristov, A. N., Oh, J., Firkins, J. L., Dijkstra, J., Kebreab, E., Waghorn, G., ... Tricarico, J. M. (2013). Special topics. Mitigation of methane and nitrous oxide emissions from animal operations: I. A review of enteric methane mitigation options. *Journal of Animal Science*, 91(11), 5045-5069. <https://doi.org/10.2527/JAS.2013-6583>
- Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria. (2015). *Protocolo para Determinación de Emisión de Metano en Rumiantes. Técnica del Trazador SF 6 para Períodos de Medición Prolongados*. Montevideo: INIA.
- Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria. (2022). *Factores de emisión y coeficientes para estudios de huella de carbono en Uruguay. Sector ganadero*. Montevideo: INIA.
- Johnson, K., y Johnson, D. (1995). Methane emissions from cattle. *Journal Animal Science*, 73, 2483-2492.
- Kellaway, R., y Harrington, Tim. (2004). *Feeding concentrates: supplements for dairy cows*. Melbourne: Landlinks.
- Kelley, N. S., Hubbard, N. E., y Erickson, K. L. (2007). Conjugated Linoleic Acid Isomers and Cancer. *The Journal of Nutrition*, 137(12), 2599-2607. <https://doi.org/10.1093/JN/137.12.2599>
- Kolver, E. S. (2003). Nutritional limitations to increased production on pasture-based systems. *Proceedings of the Nutrition Society*, 62(2), 291-300. <https://doi.org/10.1079/pns2002200>
- Kolver, E. S., y Muller, L. D. (1998). Performance and nutrient intake of high producing holstein cows consuming pasture or a total mixed ration. *Journal of Dairy Science*, 81(5), 1403-1411. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(98\)75704-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(98)75704-2)
- Kozloski, G. V. (2011). *Bioquímica dos Ruminantes* (3ª ed.). Santa María: Editoraufsm.
- Krause, K. M., y Oetzel, G. R. (2006). Understanding and preventing subacute ruminal acidosis in dairy herds: A review. *Animal Feed Science and Technology* 126(3-4), 215-236. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2005.08.004>
- Kronqvist, C., Petters, F., Robertsson, U., y Lindberg, M. (2021). Evaluation of production parameters, feed sorting behaviour and social interactions in dairy cows: Comparison of two total mixed rations with different particle size and water

- content. *Livestock Science*, 251, 104662.
<https://doi.org/10.1016/J.LIVSCI.2021.104662>
- Lourenço, M., van Ranst, G., Vlaeminck, B., de Smet, S., y Fievez, V. (2008). Influence of different dietary forages on the fatty acid composition of rumen digesta as well as ruminant meat and milk. *Animal Feed Science and Technology*, 145(1-4), 418-437. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2007.05.043>
- Loza, C. (2017). *Consumo, gasto energético y emisiones de metano de vacas lecheras pastoreando a diferentes biomásas* (Tesis de maestría). Facultad de Veterinaria, UDELAR, Montevideo.
- Martin, C., Morgavi, D. P., y Doreau, M. (2010). Methane mitigation in ruminants: From microbe to the farm scale. *Animal*, 4(3), 351-365.
<https://doi.org/10.1017/S1751731109990620>
- Mendoza, A. (2016). *Inclusión de forraje fresco en la dieta de vacas lecheras alimentadas con una ración totalmente mezclada* (Tesis de doctorado). Facultad de Veterinaria, UDELAR, Montevideo.
- Ministerio de Ambiente, y Sistema Nacional de Respuesta al Cambio Climático. (2021). *Uruguay: Inventario Nacional de Gases de Efecto Invernadero 1990 - 2019 a la Conferencia de las Partes en la Convención Marco de las Naciones Unidas sobre el Cambio Climático*. Montevideo: Ministerio de Ambiente.
- Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. (2015). *Regiones agropecuarias del Uruguay: estadísticas agropecuarias*. Recuperado de <http://www.mgap.gub.uy/dieaanterior/regiones/regiones2015.pdf>
- Moraes, L. E., Strathe, A. B., Fadel, J. G., Casper, D. P., y Kebreab, E. (2014). Prediction of enteric methane emissions from cattle. *Global Change Biology*, 20(7), 2140-2148. <https://doi.org/10.1111/gcb.12471>
- Morales, E., Soldado, A., González, A., Martínez, A., Domínguez, I., de La Roza, B., y Vicente, F. (2010). Improving the fatty acid profile of dairy cow milk by combining grazing with feeding of total mixed ration. *Journal of Dairy Research*, 77(2), 225-230. <https://doi.org/10.1017/S002202991000004X>
- National Research Council y Subcommittee on Dairy Cattle Nutrition. (2001). *Nutrient Requirements of Dairy Cattle* (7ª ed.). Washington: National Academic.
- Niu, M., Kebreab, E., Hristov, A. N., Oh, J., Arndt, C., Bannink, A., ... Yu, Z. (2018). Prediction of enteric methane production, yield, and intensity in dairy cattle using an intercontinental database. *Global Change Biology*, 24(8), 3368-3389.
<https://doi.org/10.1111/GCB.14094>
- O'Neill, B. F., Deighton, M. H., O'Loughlin, B. M., Galvin, N., O'Donovan, M., y Lewis, E. (2012). The effects of supplementing grazing dairy cows with partial mixed ration on enteric methane emissions and milk production during mid to late lactation. *Journal of Dairy Science*, 95(11), 6582-6590.
<https://doi.org/10.3168/jds.2011-5257>

- O'Neill, B. F., Deighton, M. H., O'Loughlin, B. M., Mulligan, F. J., Boland, T. M., O'Donovan, M., y Lewis, E. (2011a). Effects of a perennial ryegrass diet or total mixed ration diet offered to spring-calving Holstein-Friesian dairy cows on methane emissions, dry matter intake, and milk production. *Journal of Dairy Science*, 94(4), 1941-1951. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3361>
- O'Neill, B. F., Deighton, M. H., O'Loughlin, B. M., Mulligan, F. J., Boland, T. M., O'Donovan, M., y Lewis, E. (2011b). Effects of a perennial ryegrass diet or total mixed ration diet offered to spring-calving Holstein-Friesian dairy cows on methane emissions, dry matter intake, and milk production. *Journal of Dairy Science*, 94(4), 1941-1951. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3361>
- Pastorini, M. (2016). *Combinación de diferentes niveles de raigrásy ración totalmente mezclada en dietas de vacas lecheras: efecto sobre el desempeño productivo y eficiencia de utilización de los nutrientes* (Tesis de maestría). Facultad de Veterinaria, UDELAR, Montevideo.
- Pastorini, M., Pomiés, N., Repetto, J. L., Mendoza, A., y Cajarville, C. (2019). Productive performance and digestive response of dairy cows fed different diets combining a total mixed ration and fresh forage. *Journal of Dairy Science*, 102(5), 4118–4130. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15389>
- Pinares-Patiño, C. S., Baumont, R., y 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(4), 769-777 <https://doi.org/10.4141/A03-034>
- Pomiés, N. (2014). *Combinación de diferentes niveles de forraje fresco y ración totalmente mezclada en dietas de vacas lecheras: efecto sobre el aprovechamiento digestivo* (Tesis de maestría). Facultad de Veterinaria, UDELAR, Montevideo.
- Rebuffo, M., Risso, D. F., y Restaino, E. (2000). *Tecnología en alfalfa*. Montevideo: INIA.
- Rigout, S., Hurtaud, C., Lemoscjuet, S., Bach, A., y Rulquin, H. (2003). Lactational effect of propionic acid and duodenal glucose in cows. *Journal of Dairy Science*, 86(1), 243-253. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73603-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73603-0)
- Rushen, J., de Passillé, A. M., Keyserlingk, M. A. G., y Weary, D. M. (2008). *The Welfare of Cattle*. Amsterdam: Springer.
- Salado, E. E. (2020). *Efecto de distintas estrategias de alimentación sobre la respuesta productiva de vacas lecheras y la calidad de la leche* (Tesis de doctorado). Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Mar del Plata, Balcarce.
- Salado, E. E., Bretschneider, G., Cuatrin, A., Descalzo, A. M., y Gagliostro, G. A. (2017). Milk yield and composition and pasture ruminal digestion in grazing dairy cows receiving three levels of energy concentrate supplementation. *Agricultural Sciences*, 8(10), 1135-1156. <https://doi.org/10.4236/as.2017.810083>

- Schingoethe, D. J. (2017). A 100-Year Review: Total mixed ration feeding of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 100(12), 10143-10150. <https://doi.org/10.3168/JDS.2017-12967>
- Soder, K. J., y Muller, L. D. (2007). Case study: Use of partial total mixed rations on pasture-based dairy farms in Pennsylvania and New York. *Professional Animal Scientist*, 23(3), 300-307.
- Soriano, F. D., Polan, C. E., y Miller, C. N. (2001). Supplementing pasture to lactating Holsteins fed a total mixed ration diet. *Journal of Dairy Science*, 84(11), 2460-2468. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(01\)74696-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(01)74696-6)
- Van Vuuren, A. M., y Van Den Pol-Van Dasselaar, A. (2006). *Fresh Herbage for Dairy Cattle*. Amsterdam: Springer.
- Vibart, R. E., Fellner, V., Burns, J. C., Huntington, G. B., y Green, J. T. (2008). Performance of lactating dairy cows fed varying levels of total mixed ration and pasture. *Journal of Dairy Research*, 75(4), 471-480. <https://doi.org/10.1017/S0022029908003361>
- Vlaming, J. B., Lopez, N., Brookes, I. M., Hoskin, S. O., y Clark, H. (2008). Within- and between-animal variance in methane emissions in non-lactating dairy cows. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 48(1-2), 124-127. <https://doi.org/10.1071/EA07278>
- Waghorn, G., y Woodward, S. (2006). Ruminant contributions to methane and global warming – New Zealand perspective. En J. S. Batti, R. Lal, M. J. Apps, y M. A. Price, *Climate Change and Managed Ecosystems* (pp. 223-260). Boca Ratón: CRC.
- Zavaleta, E. (s.f.). *Los ácidos grasos volátiles, fuente de energía en los rumiantes*. Recuperado de <https://www.fmvz.unam.mx/fmvz/cienciavet/revistas/CVvol1/CVv1c09.pdf>