



**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**Programa de Posgrados**

**EMISIÓN DE METANO ENTÉRICO DE VACAS  
HOLSTEIN CON DIFERENTE NIVEL DE  
INCLUSIÓN DE PASTURA Y ORIGEN  
GENÉTICO**

**GABRIELA SILVA**

**TESIS DE MAESTRÍA EN NUTRICIÓN DE RUMIANTES**

**URUGUAY**

**2020**





**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA**  
**FACULTAD DE VETERINARIA**  
**Programa de Posgrados**

**EMISIÓN DE METANO ENTÉRICO DE VACAS  
HOLSTEIN CON DIFERENTE NIVEL DE  
INCLUSIÓN DE PASTURA Y ORIGEN  
GENÉTICO**

**Gabriela Silva**

---

**Verónica Ciganda**  
**Director de Tesis**

---

**Cecilia Cajarville**  
**Co-director**

---

**Alsiane Capelesso**  
**Co-director**

**2020**

## **INTEGRACIÓN DEL TRIBUNAL DE DEFENSA DE TESIS**

**Analía Pérez Ruchel; PhD**

Departamento de Producción Animal

Facultad de Veterinaria

Universidad de la República - Uruguay

**Patricia Ricci; PhD**

Departamento de Producción Animal

Estación Experimental Agropecuaria Balcarce

Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria - Argentina

**César Pinares Patiño; PhD**

The AgriBusiness Group – Nueva Zelanda



**FACULTAD DE VETERINARIA**  
**Programa de Posgrados**  
**ACTA DE APROBACIÓN DE TESIS**  
**DE MAESTRÍA EN NUTRICIÓN DE RUMIANTES**

**" ESTRATEGIA DE ALIMENTACIÓN Y GENOTIPO ANIMAL EN LA  
EMISIÓN DE METANO ENTÉRICO DE VACAS HOLSTEIN EN  
PASTOREO "**

**Por: DCV Gabriela SILVA**

**Directora de Tesis: Dra. Verónica Ciganda**  
**Codirectoras de Tesis: Dra. Cecilia Cajarville**  
**MSc. Alsiane Capelesso**

**Tribunal**

**Presidente: Dra. Analía Pérez Ruchel**



**Segundo Miembro: Dra. Patricia Ricci**



**Tercer Miembro: Dr. César Pinares Patiño**



**Fallo del Tribunal:**

## **Plataforma Zoom, Sala Virtual- Posgrado**

### **Viernes 16 de octubre de 2020**

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). El Tribunal firmará ambas Actas.



UNIVERSIDAD  
DE LA REPUBLICA



Facultad de Veterinaria  
Universidad de la República  
Uruguay

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA  
FACULTAD DE VETERINARIA  
**Posgrados Académicos y Especializaciones**

El Tribunal considera que la maestranda Gabriela Silva ha realizado un trabajo de tesis adecuado para la obtención del título, con una buena redacción escrita, adecuada revisión bibliográfica para sustentar la hipótesis y objetivos planteados.

Los resultados obtenidos se presentan de forma clara, siendo un aporte al conocimiento de las emisiones de metano entérico de vacas Holstein en pastoreo, muy relevante para nuestro país y también a nivel internacional. Además, abre nuevas interrogantes vinculadas a la temática.

La defensa oral fue clara, concisa y amena, respaldada por un adecuado material audiovisual, demostrando profundo conocimiento y responsabilidad en el desarrollo del trabajo de Tesis.

Destacamos la solvencia en el razonamiento llevado a cabo en las respuestas a las preguntas planteadas por el Tribunal, que denotan el grado de compromiso durante el proceso de formación.

Por lo anteriormente expresado, el Tribunal califica el trabajo de Tesis de Gabriela Silva como Excelente, APROBADO (S.S.S, 12).

Dra. Analía Pérez Ruchel  
Presidente del Tribunal

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero agradecer a todos los que me apoyaron y ayudaron desde el inicio con la realización de este trabajo, en especial:

A Verónica Ciganda por orientarme, confiar plenamente y transmitir siempre tranquilidad y ánimo.

A Cecilia Cajarville por confiar en mí nuevamente, instruirme y responder siempre en cada auxilio.

A Alsiane Capelesso por su dedicación completa, paciencia, enseñanza y amistad. .

A Julieta Mariotta por su gran compañerismo, apoyo y dedicación en el desarrollo de este trabajo.

A Alejandro Mendoza por su dedicación, recomendaciones y apoyo en todo el proceso de este trabajo.

A todo el equipo de la Unidad de Lechería de INIA La Estanzuela, por la colaboración brindada y la buena onda para trabajar.

A Cecilia, Favio, Ana y Nicole por su esfuerzo, dedicación y compromiso con el desarrollo del experimento.

A todos los compañeros/amigos de Beca de Maestría de INIA por el apoyo, amistad y colaboración en el desarrollo del experimento.

Al programa de Becas de Maestría INIA por la financiación.

A mi madre y mis hermanos por alentarme y apoyarme siempre.

A Javi, por estar siempre a mi lado y por su apoyo incondicional.

A todos, muchas gracias.

## Tabla de Contenidos

|                                                                                           |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Lista de Abreviaturas.....                                                                | i  |
| Resumen .....                                                                             | 1  |
| Abstract.....                                                                             | 2  |
| Capítulo 1. Introducción .....                                                            | 3  |
| Capítulo 2. Antecedentes Específicos .....                                                | 4  |
| Contribución de Uruguay en las emisiones de metano.....                                   | 4  |
| Formación del metano entérico en los rumiantes .....                                      | 5  |
| Características de la dieta en las emisiones de metano .....                              | 7  |
| Efecto del genotipo de vacas lecheras en las emisiones de metano .....                    | 9  |
| Capítulo 3. Hipótesis y Objetivos.....                                                    | 12 |
| 3.1 Hipótesis .....                                                                       | 12 |
| 3.2 Objetivos.....                                                                        | 12 |
| Capítulo 4. Materiales y Métodos .....                                                    | 12 |
| 4.1 Lugar y entorno experimental.....                                                     | 12 |
| 4.2 Diseño experimental .....                                                             | 13 |
| 4.3 Alimentación, Manejo del Pastoreo y Análisis de los Alimentos .....                   | 14 |
| 4.4 Determinación del Consumo de Materia Seca y Digestibilidad Aparente de la Dieta ..... | 16 |
| 4.5 Producción y Composición de la Leche .....                                            | 17 |
| 4.6 Medición de Metano Entérico .....                                                     | 17 |
| 4.7 Extracción y Análisis de Líquido Ruminal .....                                        | 19 |
| 4.8 Análisis Estadístico .....                                                            | 19 |
| Capítulo 5. Resultados.....                                                               | 20 |
| Capítulo 6. Discusión .....                                                               | 25 |
| Capítulo 7. Conclusiones.....                                                             | 31 |
| Referencias Bibliográficas.....                                                           | 32 |

## **Lista de Abreviaturas**

AGV: ácidos grasos volátiles

CH<sub>4</sub>: metano entérico

CMS: consumo de materia seca

CO<sub>2</sub>: dióxido de carbono

DMO: digestibilidad de la materia orgánica

DMS: digestibilidad de la materia seca

EB: energía bruta

EM: energía metabolizable

FDA: fibra detergente ácido

FDN: fibra detergente neutro

FDNi: fibra detergente neutro indigestible

GEI: gases de efecto invernadero

H<sub>2</sub>: hidrogeniones

LCG 4%: leche corregida por grasa al 4%

LGA: lignina

MO: materia orgánica

MS: materia seca

NAH: Holstein de origen norteamericana

NZH: Holstein de origen neozelandés

PH: producción diaria de heces

RPM: ración parcialmente mezclada

RTM: ración totalmente mezclada

SF<sub>6</sub>: hexafluoruro de azufre

TiO<sub>2</sub>: dióxido de titanio

TL: tasa de liberación de SF<sub>6</sub>

Y<sub>m</sub>: porcentaje de la energía bruta consumida que se pierde como metano

## Resumen

El objetivo de este estudio fue cuantificar las emisiones de metano entérico ( $\text{CH}_4$ ) en vacas lecheras en producción bajo dos estrategias de alimentación y dos orígenes genéticos diferentes, predominantes en los sistemas lecheros de Uruguay. Se emplearon 12 animales por tratamiento, previamente bloqueados por días de lactancia, producción, número de lactancia y peso vivo. Se utilizaron tres tratamientos que combinan estrategia de alimentación y origen genético: i. Pastura Fija (al 37% de la dieta) - Holstein de origen norteamericano (FixP NAH); ii. Pastura Máxima (>70% de la dieta) - Holstein de origen norteamericano (MaxP NAH) y iii. Pastura Máxima - Holstein de origen neozelandés (MaxP NZH). Todas las dietas suministradas mantuvieron la misma relación forraje concentrado (F/C) de 72/28, pero la proporción de pastura y la forma de suministro del resto de los alimentos fue diferente entre estrategias de alimentación. Los tratamientos MaxP tuvieron dos turnos de pastoreo y en cada ordeño se suministraba a cada vaca un concentrado comercial en comederos individuales. El tratamiento FixP tuvo un solo turno de pastoreo en la tarde y después del ordeño de la mañana, las vacas eran alimentadas con una ración parcialmente mezclada (RPM) en comederos individuales. Los genotipos utilizados fueron Holstein con más de 75% de genética de origen norteamericana (NAH) y Holstein con más de 75% de genética de origen neozelandés (NZH). El estudio se realizó durante un total de 21 días, incluyendo un acostumbamiento de ocho días y dos períodos de mediciones de  $\text{CH}_4$  de cinco días cada uno, con un intervalo de tres días entre períodos. La emisión de  $\text{CH}_4$  se midió utilizando la técnica del trazador  $\text{SF}_6$ . Simultáneamente se determinó el consumo de RPM y concentrado por diferencia entre oferta y rechazo diario, mientras que el CMS de pastura se estimó utilizando  $\text{TiO}_2$  y fibra detergente neutro indigestible. A su vez, se determinaron los coeficientes de digestibilidad aparente total del tracto para MS, MO, FDN y FDA. Diariamente durante los períodos de mediciones se registró la producción de leche y se analizó para determinar la concentración de sólidos. El último día de cada período se tomó muestra del líquido ruminal mediante sonda esofágica para determinar el pH y las concentraciones de ácidos grasos volátiles y  $\text{NH}_3$ . Las vacas NAH con diferente estrategia de alimentación tuvieron igual consumo total (17,1 kg MS;  $P>0,1$ ), de FDN, de FDA y de EB. También registraron similar producción de leche corregida por grasa al 4% (LCG 4%), producción de proteína, de lactosa y de sólidos ( $P>0,1$ ). Sin embargo, las vacas de la estrategia FixP tuvieron mayor digestibilidad de la MS (70,5% vs. 68,5%;  $P<0,05$ ) y de la MO (70,2 vs. 68%;  $P<0,05$ ) que las vacas en MaxP. Para todos los parámetros del líquido ruminal evaluados también se encontraron diferencias entre estrategias. Sin embargo, entre las estrategias de alimentación no se encontraron diferencias en las emisiones de  $\text{CH}_4$  en ninguna de sus formas de expresión. Las vacas NZH en comparación con las NAH en MaxP tuvieron menor consumo (17,1 vs. 13,7 kg de MS;  $P<0,05$ ), menor digestibilidad de la MS, de la MO y de la FDA. También tuvieron menor producción de LCG 4% y de sólidos totales ( $P<0,05$ ). La emisión diaria de  $\text{CH}_4$  entre genotipos tampoco fue diferente, sin embargo, la emisión de  $\text{CH}_4$  por kg MS, kg LCG 4% y  $\text{Ym}$  fue mayor en las vacas NZH que en las vacas NAH. La relación acético/propiónico y acético+butírico/propiónico no fue diferente entre las vacas de diferente origen genético. Se concluye que entre estrategias la emisión de  $\text{CH}_4$  no fue diferente pero sí la intensidad de emisión de  $\text{CH}_4$  fue diferente entre los orígenes genéticos utilizados. La emisión diaria no fue diferente entre NAH y NZH, pero las NZH tuvieron menor CMS y LCG 4% lo que explica la mayor intensidad de  $\text{CH}_4$  encontrada.

## **Abstract**

The aim of this study was quantify the enteric methane emission from dairy cows with two feed strategies and two different genetic origins that prevail in the Uruguay 'dairy systems. Thus, 12 animals were blocked according to days in milk, production, parity and body weight. Three treatments were used that combine feed strategy and genetic origin: i. Fix Pasture (37% of pasture in the diet) - Holstein North American origin (FixP NAH); ii. Maximum Pasture (>70% of the diet) - Holstein North American origin (MaxP NAH) and iii. Maximum Pasture - Holstein New Zealand origin (MaxP NZH). All the diets had the same forage concentrate ratio (F/C) that was 72/28, but the amount of pasture and how the feed were provided was different between strategies. The MaxP treatments had two season of grazing and in each milking a commercial concentrate was provided to each cow individually. FixP treatment had only one afternoon grazing's season and after morning milking cows were feed individually with partial mixed ration. The genotypes used were Holstein with more than 75% of North American genetic (NAH) and Holstein with more than 75% New Zealand genetic (NZH). This study was conducted during 23 days with an adaptation of 8 days and we had two measurements period of 5 days each one with an interval of 3 days between each period. The methane emission was measure using the SF<sub>6</sub> technique. At the same time, the intake of PMR and concentrate was measured between the difference of the daily offer and ort while the dry matter intake of pasture was estimated using TiO<sub>2</sub> and indigestible neutral detergent fiber. Furthermore, digestibility coefficients of DM, OM, NDF, ADF was determinated. The last day of each measurement period, ruminal liquid was extracted with an esophagus tube to determinate pH, volatile fatty acid and NH<sub>3</sub>. North American cows with different feed strategy had the same total intake (17.1 kg DM; P>0.1), NDF, ADF and brut energy. Also, the cows had equal 4% fat corrected milk (FCM 4%), protein yield, lactose yield and solid (P>0.1). However, the cows in the FixP strategy had more DM digestibility (70.5% vs. 68.5%; P<0.05) and OM digestibility (70.2 vs. 68%; P<0.05). All the rumen characteristics evaluated were different between strategies. Nevertheless, methane emission was not different between feed strategies in none of the each expression form. New Zealand cows compared to NAH in MaxP had less intake (17.1 vs. 13.7 kg of DM; P<0.05), less total, organic matter and ADF digestibility. Also, FCM 4% and total solid in NZH were less than NAH (P<0.05). Daily methane emission was not different between genotypes. However, CH<sub>4</sub>/kg DM, per kg FCM 4% and Ym were higher in NZH cows than NAH cows. Acetic/propionic ratio and acetic+butyric/propionic ratio were not different among cows in different genetic origin. This study concludes that between strategies CH<sub>4</sub> emission in not different, but there are differences in the methane intensity between the genotypes used. Daily methane emission was not different between NAH and NZH cows, but NZH cows had less DMI and FCM 4% so NZH cows had more CH<sub>4</sub> intensity than NAH in the same feed strategy.

Keywords: *methane, dairy cow, intake, genetic origin*



## Capítulo 1. Introducción

Los gases de efecto invernadero (GEI) son los responsables del calentamiento atmosférico y del cambio climático global. Los principales GEI son el vapor de agua, el dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), el metano (CH<sub>4</sub>) y el óxido nitroso (N<sub>2</sub>O).

El CH<sub>4</sub>, además de tener un potencial de calentamiento global 28 veces mayor al CO<sub>2</sub> (IPCC, 2014), es el GEI más importante en los sistemas de producción de rumiantes. Mundialmente, el sector ganadero es responsable del 14,5% del total de las emisiones de GEI y el ganado lechero representa un 18,9% de estas emisiones, principalmente en la forma de CH<sub>4</sub> entérico (Negussie et al., 2017).

En Uruguay, para el Inventario Nacional de Emisiones de Gases de Efecto Invernadero (INGEI) de 2017, la fermentación entérica proveniente de los rumiantes es responsable del 46,1% de las emisiones nacionales de GEI. A su vez, del total de los GEI emitidos, el metano representa el 47,5% del total de las emisiones, siendo el principal gas emitido (MVOTMA, 2019).

La gran participación que tiene la fermentación entérica en las emisiones de CH<sub>4</sub> se debe fundamentalmente a que la producción pecuaria de Uruguay está orientada principalmente a la producción de carne (vacuna y ovina), leche y lana. Uruguay cuenta con 3,688 establecimientos dedicados a la lechería que suman un total de 766,000 vacunos lecheros (DIEA, 2019). Dentro de los genotipos animales utilizados en el sistema de producción de leche de Uruguay la raza Holstein de origen americano y canadiense representan el 83% de la población, Holstein de origen neozelandés un 6%; mientras que las cruizas, junto a las razas Jersey y Normando, suman el 11% restante (INALE, 2014).

Los sistemas de producción de leche en Uruguay son fundamentalmente pastoriles, con suplementación a base de reservas de forrajes y concentrados, representando el pasto de cosecha directa entre el 48 y 54% de la dieta de los animales en el año (Chilibroste, 2015). La mayor limitante que presentan los sistemas pastoriles es la dificultad de asegurar una oferta constante de alimento en cantidad y calidad a lo largo del año (Cajarville et al., 2012). Por este motivo, el uso de estrategias de alimentación que combinan el uso de pasturas con el aporte de ración parcialmente mezclada (RPM) es cada vez más frecuente en nuestro país.

En este sentido, es importante destacar que la composición de la dieta y el nivel de consumo son los principales factores que afectan la producción de CH<sub>4</sub> entérico por los rumiantes (Archimède et al., 2011).

A su vez, las emisiones de metano significan una pérdida de la energía bruta (EB) consumida por los rumiantes, representando una ineficiencia en la utilización de los alimentos que en vacas lecheras podría destinarse para producción de leche. Estas pérdidas rondan entre el 2 y 12% del consumo de EB (Johnson & Johnson, 1995). Además, el potencial contaminante de una vaca está muy influenciado por su mérito genético y por el sistema de producción en el que actúa. En este sentido, Chagunda et al. (2009) observaron que el genotipo y el régimen de alimentación influyen en las emisiones de metano entérico de las vacas.

Por lo tanto, esta tesis se enfoca en estudiar las emisiones de CH<sub>4</sub> entérico en vacas lecheras bajo un sistema pastoril utilizando diferentes estrategias de alimentación y vacas de dos orígenes genéticos diferentes.

## Capítulo 2. Antecedentes Específicos

### Contribución de Uruguay en las emisiones de metano

En Uruguay, para el año 2017, las emisiones de CH<sub>4</sub> totalizan 773,3 Gg y son generadas fundamentalmente por el sector agricultura, silvicultura y otros usos de la tierra (AFOLU por su sigla en inglés), representando un 93,4% del total de las emisiones de este gas. Dentro de este sector, del total de las emisiones de CH<sub>4</sub>, el 96% se origina por la fermentación entérica del ganado vacuno. Dentro de éstas, el tipo de animal que más contribuye a la emisión de CH<sub>4</sub> por individuo es el ganado lechero con 107,88 kg CH<sub>4</sub>/cabeza/año mientras que para el ganado no lechero las emisiones son de 53,81 kg CH<sub>4</sub>/cabeza/año (MVOTMA, 2019).

Si bien Uruguay es responsable únicamente del 0,06% de las emisiones mundiales de GEI, el país ratificó el acuerdo de París sobre el clima celebrado en diciembre del 2015. A partir de ese momento, se comprometió a establecer los mecanismos operativos e instrumentales para reducir las emisiones y remitir periódicamente un informe que explique las acciones llevadas a cabo para lograr los objetivos planteados.

Debido a la relevancia que tienen las emisiones de CH<sub>4</sub> entérico provenientes de la fermentación entérica del ganado, en el último inventario (INGEI, 2017) se realizaron esfuerzos importantes para mejorar la calidad de la información utilizada para las estimaciones provenientes de los rumiantes. Se emplearon factores de emisión específicos para las condiciones del país para algunas categorías claves, con el uso de la metodología Tier 2 (MVOTMA, 2019)

Para el caso específico de ganado bovino no lechero se ajustaron y recalcularon los factores de emisión nacionales sobre la base del desempeño productivo de los animales, los sistemas de producción y alimentación, determinación de pesos corporales y las variaciones anuales por categoría. En este sentido mediante la investigación se han refinado estos factores de emisión de metano para ganado de carne y es esperable tener datos también para el ganado lechero (MVOTMA, 2019).

En el caso de bovinos lecheros, existen en Uruguay sólo dos estudios focalizados en la estimación de las emisiones de CH<sub>4</sub> entérico, y ambos estudios trabajaron con dietas exclusivamente pastoriles, utilizando la técnica de medición del trazador SF<sub>6</sub> descrita por Johnson et al. (1994). Dini et al. (2012) encontraron que las emisiones de CH<sub>4</sub> de vacas lecheras no fueron afectadas por el contenido de leguminosas de la pastura, y reportaron una emisión promedio diaria de CH<sub>4</sub> de 368 gramos/animal/día, y una intensidad de emisión de CH<sub>4</sub>, conocido como “methane yield” (Y<sub>m</sub>), de 6,5% de la energía bruta (EB) consumida. En esta misma línea de trabajo, Loza (2017) tampoco encontró diferencias entre las emisiones de CH<sub>4</sub> en vacas pastoreando praderas con diferente disponibilidad de biomasa, quien reportó una misma emisión promedio diaria de CH<sub>4</sub> (363 gramos/animal/día) y un Y<sub>m</sub> de 7,0%.

Es importante destacar que los sistemas de alimentación de vacas lecheras predominantes en el país se caracterizan por su base pastoril y por la utilización de suplementos para corregir el desbalance nutricional que se encuentra entre la oferta y demanda de nutrientes cuando se utilizan solamente pasturas (Meikle et al., 2013; Fariña y Chilibróste, 2019). Por lo tanto, si bien las pasturas siguen siendo un componente individual mayoritario de las dietas, la participación de otros alimentos ha aumentado (Cajarville et al., 2012) como ser

RPM y concentrados. Esta modificación en la composición de la dieta respecto a una dieta 100% pastoril, podría estar alterando los procesos de fermentación entérica, y en consecuencia las emisiones de CH<sub>4</sub>. Sin embargo, no se han reportado resultados de emisiones de CH<sub>4</sub> que hayan tenido en cuenta esta característica de la dieta de nuestros sistemas lecheros. Existe la necesidad, por lo tanto, de conocer las emisiones de CH<sub>4</sub> entérico en los sistemas lecheros de nuestro país basados en pasturas con utilización de suplementos.

En este sentido, el presente estudio se ha planeado para cuantificar las emisiones de metano en los sistemas de alimentación predominante en el país: sistemas pastoriles con suplementación de concentrado en la sala de ordeño o con suplementación con RPM en pista de alimentación. El suministro del concentrado durante el ordeño es utilizado en el 83 a 85% de los establecimientos lecheros (Fariña y Chilbroste, 2019).

### **Formación del metano entérico en los rumiantes**

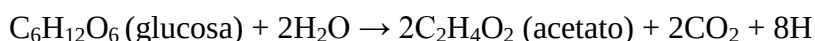
Los rumiantes, particularmente los bovinos, tienen una gran capacidad de aprovechar y convertir material fibroso con alto contenido de carbohidratos estructurales en alimentos de alta calidad como la carne y la leche. Para ello, los rumiantes tienen un sistema especializado de digestión que involucra la fermentación microbiana, a través de la cual los animales adquieren la energía de los alimentos (McDonald, 2011).

Los carbohidratos estructurales, proteínas y otros polímeros orgánicos, con excepción de los lípidos, contenidos en el alimento ingerido por los rumiantes, son degradados a monómeros por la fermentación anaeróbica primaria. Los monómeros son convertidos en ácidos grasos volátiles (AGV) (principalmente acetato, propionato y butirato), CO<sub>2</sub> e hidrogeniones (H<sub>2</sub>) por una diversa población de microorganismos existentes en el rumen (Morgavi et al., 2010). En tanto que los lípidos sufren lipólisis.

Los AGV producidos en el rumen son absorbidos a través de la pared ruminal y utilizados como fuente de energía mientras que parte del H<sub>2</sub> producido es utilizado para la producción de CH<sub>4</sub> (Pickering et al., 2015). La mayoría del CO<sub>2</sub> y el CH<sub>4</sub> son removidos del rumen mediante eructación y exhalación (Clark et al., 2005), mientras que aproximadamente el 3% de los gases producidos durante la fermentación son emitidos por el recto (Muñoz et al., 2012).

El proceso de producción de CH<sub>4</sub>, o metanogénesis, es llevado a cabo principalmente por los microorganismo metanógenos presentes en el rumen, pertenecientes al dominio *arquea*, un grupo microbiano diferente a las *Eukarya* (protozoarios y hongos) y *Bacterias* ya que tienen cofactores y lípidos únicos (Machado & Chaves, 2011). Estos microorganismos utilizan los productos finales resultantes de la fermentación del alimento ingerido, particularmente el hidrógeno, como sustrato para la producción de CH<sub>4</sub>.

Como resultado del proceso de fermentación de la glucosa para formar los principales AGV mediante la vía piruvato se liberan hidrógenos, tal como se muestra en las reacciones presentes a continuación:



En estas reacciones se puede visualizar que durante la formación de acetato y butirato en el rumen se libera hidrógeno, el cual puede ser utilizado por las arqueas para la formación de CH<sub>4</sub>, mientras que la formación de propionato puede considerarse una vía competitiva para el uso de hidrógeno (Moss et al., 2000).

Con esto, Moss et al., (2000) establecieron que la producción de CH<sub>4</sub> se puede calcular de la estequiometría de los principales AGV formados durante el proceso de fermentación con la siguiente ecuación:  $CH_4 = 0,45 C_2 - 0,275 C_3 + 0,40 C_4$ ; donde C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub> y C<sub>4</sub> son moléculas de acetato, propionato y butirato, respectivamente. Por lo tanto, el porcentaje molar de AGV influye en la producción de CH<sub>4</sub> en el rumen.

Simplificado de otra manera, en la Figura 1, se puede ver que el resultado de las posibles vías de la fermentación de la glucosa resulta en diferentes cantidades de H<sub>2</sub> formado y así la estequiometría de la formación de CH<sub>4</sub> varía (Janssen, 2010).

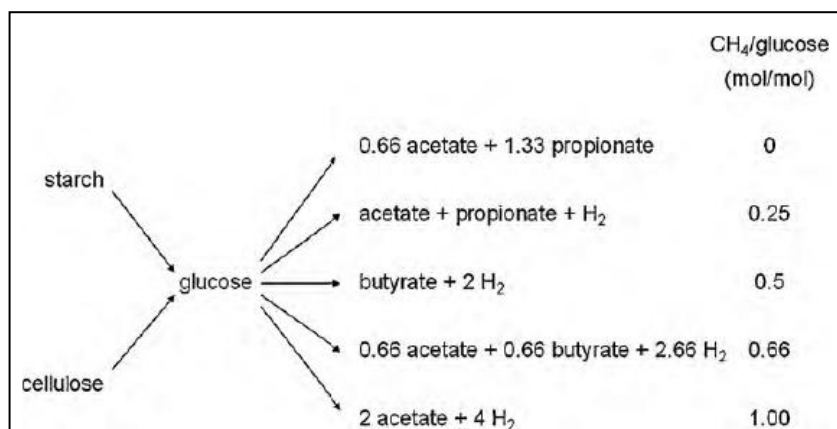


Figura 1. Posibles vías de fermentación de celulosa y almidón a través de glucosa, a acetato, propionato, butirato y H<sub>2</sub> (Janssen, 2010).

La formación de CH<sub>4</sub> en el rumen es el principal camino para la eliminación del hidrógeno a través de la siguiente reacción:  $CO_2 + 4H_2 \rightarrow CH_4 + 2H_2O$ . Por este motivo, la cantidad de CH<sub>4</sub> formado por unidad de alimento digerido depende de la cantidad de H<sub>2</sub> formado y, por lo tanto, de las actividades relativas de las especies de microorganismos que usan cada una de las formaciones de CH<sub>4</sub> a partir de la glucosa (Janssen, 2010).

La fermentación en los rumiantes incluye procesos oxidativos, los cuales generan cofactores reducidos (NADH, NADPH y FADH). Para que el proceso de fermentación no se detenga, estos factores son re oxidados (NAD<sup>+</sup>, NADP<sup>+</sup> y FAD<sup>+</sup>) por medio de reacciones de deshidrogenación, liberando H<sub>2</sub> al rumen (Machado & Chaves, 2011).

La síntesis de CH<sub>4</sub> contribuye a la eficiencia del sistema ya que evita incrementar la presión parcial de H<sub>2</sub> a niveles que podrían inhibir el normal funcionamiento de las enzimas microbianas, principalmente aquellas involucradas en las reacciones de transferencia de electrones y en particular la NADH deshidrogenasa, que resultaría en una acumulación de NADH y finalmente en una reducción de la fermentación ruminal (Morgavi et al., 2010).

Las arqueas metanógenas utilizan el proceso de formación de CH<sub>4</sub> para generar energía para su crecimiento y como sustratos principales usan el H<sub>2</sub>, el CO<sub>2</sub> y el ácido fórmico (Boadi et al., 2004), producidos principalmente por una compleja comunidad de protozoarios ciliados, bacterias y hongos anaeróbicos. Los protozoarios ciliados producen abundante H<sub>2</sub> y su remoción (defaunación) resulta en promedio 11% menos emisión de

CH<sub>4</sub> (Tapio et al., 2017). Por lo tanto, en la compleja comunidad microbiana de los rumiantes, muchos microorganismos tienen una importante influencia en la producción de CH<sub>4</sub>, sea por proporcionar un ambiente adecuado para la sobrevivencia de las metanógenas o por producir sustratos utilizados por las mismas (Machado & Chaves, 2011).

Dependiendo del tipo de dieta, el pH del líquido ruminal en condiciones fisiológicas normales varía entre 5,6 y 6,7. Al valor más bajo de ese intervalo, las metanógenas son parcialmente inhibidas y su población disminuye o están menos activas. Por lo tanto, el rango de pH óptimo para el crecimiento de las metanógenas es de 6,0 a 7,5 y el límite más bajo está entre 5,5 y 6,5. Esto significa que las tasas más elevadas de crecimiento son alcanzadas en valores de pH cercanos a la neutralidad, y el crecimiento es menor a medida que el pH del rumen disminuye (Machado & Chaves, 2011).

Dentro del conjunto de arqueas que se encuentran en el rumen, las *Methanobrevibacter spp* son las que predominan y representan cerca de dos tercios de las arqueas totales. El tercio restante, está compuesto en partes más o menos iguales por filotipos pertenecientes al *Methanomicrobium* y al grupo ruminal C (Morgavi et al., 2010). Sin embargo, la abundancia de las arqueas tiene una débil relación con la emisión de CH<sub>4</sub> mientras que cómo está compuesta la comunidad de las arqueas parece tener una relación más fuerte con las emisiones de CH<sub>4</sub> (Tapio et al., 2017).

### **Características de la dieta en las emisiones de metano**

Como se mencionó anteriormente, es bien conocido que la composición de la dieta afecta las emisiones de CH<sub>4</sub>. Por lo tanto, numerosos trabajos han estudiado los efectos nutricionales en la producción de CH<sub>4</sub>. A partir de esto, también se han desarrollado diversos modelos para predecir las emisiones de CH<sub>4</sub> basados en las características de la dieta.

Varios estudios, en sistemas de alimentación que utilizan ración totalmente mezclada (RTM), han demostrado que el incremento del nivel de concentrado en la dieta reduce la proporción de energía de la dieta que es perdida como CH<sub>4</sub>, debido principalmente a los cambios que ocurren en la fermentación ruminal (Beauchemin et al., 2008). El incremento del nivel de almidón o de carbohidratos rápidamente fermentable en la dieta podría incrementar la producción de propionato en el rumen, reduciendo la producción de hidrógenos y por lo tanto la formación de CH<sub>4</sub> (O'Neill et al., 2012).

A su vez, la relación acetato propionato (A/P) está fuertemente determinada por la relación forraje concentrado (F/C) del alimento ingerido. Cuanto menor es la relación F/C, mayor cantidad de propionato es producido. Por lo tanto, es esperable que la producción de metano sea menor cuando la alimentación del rumiante está basada en dietas con alto contenido de concentrado (Moss et al., 2000).

Aguerre et al. (2011) encontraron que vacas alimentadas con una RTM con una relación F/C de 47/53, emitieron 17% menos CH<sub>4</sub> que vacas con una dieta con una relación F/C de 68/32, pero sin encontrar una asociación con la relación A/P. Por otra parte, los estudios realizados en sistemas pastoriles son menos y se han encontrado diferentes resultados en la emisión de CH<sub>4</sub> en respuesta a la suplementación.

En Chile se realizó un estudio que concluyó que la suplementación con un nivel moderado de concentrado (1 o 5 kg por vaca por día) no tuvo efecto en mitigar las emisiones de CH<sub>4</sub> entérico en vacas Holstein pastoreando pasturas de alta digestibilidad, atribuyendo estos

resultados, en parte, al bajo nivel de suplementación (5 a 23% de la MS de la dieta) que no logra alterar la fermentación ruminal para reducir las emisiones de metano (Muñoz et al., 2015). Los rumiantes alimentados con mezclas de forraje y granos parecen producir tanto CH<sub>4</sub> como aquellos alimentados sólo con forraje, a menos que el grano constituya más de la mitad de la mezcla (Janssen, 2010) debido a que la concentración de propionato a nivel ruminal incrementa cuando se pasa de un nivel bajo a un nivel alto de concentrados en la dieta (Christophersen et al., 2008)

Sin embargo, Jiao et al. (2014) en el trabajo realizado en Reino Unido, sí encontraron una disminución de las emisiones de CH<sub>4</sub> tanto por unidad de CMS como por unidad de leche corregida por energía, a medida que se incrementó la suplementación con concentrado a vacas pastoreando una pastura dominada por raigrás perenne. En el trabajo de Jiao et al. (2014), el nivel de concentrado utilizado fue de 2, 4, 6 y 8 kg/vaca/día correspondiente a una proporción de forraje en la dieta de 88, 75, 66 y 54% respectivamente. En términos de energía, las emisiones de CH<sub>4</sub> representaron 5,9, 5,7, 5,3 y 5,4% del consumo de EB en los niveles de suplementación 2, 4, 6 y 8 kg/vaca; mientras que los correspondientes emisiones de CH<sub>4</sub> por kg de CMS fueron 20,0, 19,3, 17,7 y 18,1 g/kg, respectivamente. A su vez las emisiones de CH<sub>4</sub> por kg de leche corregida por energía fueron 14,1, 12,5, 11,4 y 11,1 g/kg, respectivamente.

Reducción en la intensidad de las emisiones de CH<sub>4</sub> (CH<sub>4</sub>/kg de leche) en respuesta a la suplementación con concentrado también fue encontrado por Wyngaard et al., (2018) en el trabajo realizado en Sudáfrica pero con vacas Jersey. El nivel de concentrado utilizado para la suplementación fue similar al anterior, siendo en este caso de 0, 4 y 8 kg/vaca/día y también bajo pastoreo. La pastura consistió en una mezcla de *Lolium perenne* L (69%), *Pennisetum clandestinum* (6%), *Trifolium repens* (8%) y *Lolium multiflorum* y *Paspalum dilatatum* (17%). Los valores reportados de CH<sub>4</sub>/kg de leche fueron de 20,4, 19,8 y 15,9, respectivamente para cada nivel de suplementación. Si bien, para todas las demás variables de CH<sub>4</sub>, la emisión disminuyó numéricamente con el incremento de la suplementación, no se logró obtener diferencias significativas. Los autores atribuyen este hecho al alto coeficiente de variación en la producción de CH<sub>4</sub>, que pudo afectar la falta de respuesta del tratamiento a la emisión de CH<sub>4</sub>. Ellos explican que hubo una estricta asignación de la pastura que pudo haber provocado competencia entre los animales, resultando en un consumo de pastura variable día a día que podría haber aumentado el coeficiente de variación en las emisiones de CH<sub>4</sub>.

También se evaluó, en sistemas pastoriles, la suplementación con RPM y diferentes niveles de asignación de pastura o tiempos de acceso a la pastura. En el trabajo realizado por O'Neill et al. (2012) no se encontraron diferencias en la intensidad de la emisión de CH<sub>4</sub> entre vacas pastoreando a baja o alta asignación de pastura y vacas con baja asignación pero suplementadas con RPM dado que las tres dietas presentaban similar calidad en cuanto a la digestibilidad de la materia orgánica.

Dall-Orsoletta et al. (2016) encontraron mayor emisión de CH<sub>4</sub> en vacas consumiendo 100% RTM que vacas en pastoreo de raigrás suplementadas con RPM, relacionando estas diferencias al mayor contenido de FDN de la RTM y a la relación FDA/FDN ya que el CMS fue similar entre tratamientos. A su vez, soportan la idea de que el raigrás contenía carbohidratos de pared celular más rápidamente degradables que el silo de maíz de la RTM.

También se ha evaluado el uso de dietas 100% pastoriles y RTM en las emisiones de CH<sub>4</sub>. O'Neill et al. (2011) y Dall-Orsoletta et al. (2016), reportaron que vacas lecheras consumiendo raigrás de alta calidad en primavera emitían menos CH<sub>4</sub> que vacas

consumiendo RTM. Los autores atribuyen estos resultados al menor consumo de materia seca de las vacas en pastoreo y a su vez a la mayor digestibilidad de la materia orgánica que presentó la pastura en comparación con la RTM (83,0 vs. 76,8% respectivamente). Un incremento en la digestibilidad del alimento resulta en mayor fermentación ruminal y por lo tanto el pH es menor. Como consecuencia, por un lado se inhibe el crecimiento de las metanógenas y protozoarios y por otro lado, el bajo pH ruminal también resulta en menor digestibilidad de la fibra, disminuyendo, ambos factores, la producción de CH<sub>4</sub> (O'Neill et al., 2011). En este estudio, las vacas en pastoreo produjeron menos CH<sub>4</sub> por vaca, por unidad de CMS y por unidad de producción de grasa más proteína en la leche que las vacas en RTM, siendo que estas últimas tuvieron mayor producción de grasa y proteína en la leche, pero este aumento no fue lo suficientemente grande como para compensar la mayor cantidad de CH<sub>4</sub> producido.

Ha sido ampliamente estudiado también cómo las diferentes fuentes de forraje afectan las emisiones de CH<sub>4</sub> en sistemas de alimentación con RTM. Particularmente, reemplazar una fuente de forraje rica en fibra (silo de pastura) por una fuente de forraje rica en almidón (silo de maíz) disminuye la emisión de CH<sub>4</sub> en vacas lecheras, pero esto depende de tener una concentración determinada de almidón en la dieta (van Gastelen et al., 2015 ; Hammond et al., 2016). Por este motivo, los resultados que se encuentran en la literatura, en cuanto a la respuesta en la emisión de CH<sub>4</sub> según la fuente de forraje utilizada, depende mucho de cómo sea la composición nutricional de los alimentos.

Cuando los rumiantes son alimentados con dietas con una gran proporción de forraje, más CH<sub>4</sub> es generado por unidad de alimento digerido, que cuando se utilizan dietas con alto contenido de grano. Esto se debe a la presencia de componentes de la pared celular, celulosa y hemicelulosa, de los forrajes que son menos fácilmente degradados que el almidón (Janssen, 2010).

A su vez, un factor muy importante en la emisión de CH<sub>4</sub> es la tasa de pasaje del alimento a través del rumen. Con una mayor tasa de pasaje, asociado a altos consumos de materia seca se espera una menor producción de CH<sub>4</sub> por unidad de alimento digerido en el rumen (Janssen, 2010).

Hasta donde nuestro conocimiento alcanza, ningún estudio ha evaluado la emisión de metano entérico en vacas lecheras en sistemas pastoriles con diferentes estrategias de alimentación, dónde el consumo de nutrientes sea similar entre tratamientos pero se utilicen distintos alimentos y formas de suministro. Además, son pocos los trabajos que relacionan el metano con las características del líquido ruminal y la digestibilidad de la dieta.

### **Efecto del genotipo de vacas lecheras en las emisiones de metano**

El potencial aporte de CH<sub>4</sub> de una vaca está muy influenciado por su mérito genético y por el sistema de producción en el que actúa (Chagunda et al., 2009). El uso de animales eficientes en la utilización del alimento, con alta producción de leche y con baja producción de CH<sub>4</sub> por unidad de producto, sería beneficioso para los productores y para el ambiente (Olijhoek et al., 2018).

Según Robertson y Waghorn (2002), el efecto del genotipo en la producción de metano por unidad de consumo de alimento abre oportunidades sustanciales para la selección

genética de individuos que tienen una menor producción de metano cuando se alimentan con dietas contrastantes.

Existe un potencial para reducir las emisiones de metano seleccionando los animales que presenten mejor eficiencia de alimentación (Bell et al., 2010; Dini et al., 2019). Del mismo modo, usar vacas con un nivel alto de producción de leche, en vez de vacas de baja producción puede ser efectivo para reducir las emisiones de  $\text{CH}_4$  entérico por unidad de producto (Yan et al., 2010). En este sentido, Chagunda et al. (2009) realizaron un estudio con dos niveles de forraje en la dieta (alto y bajo) y con dos genotipos diferentes basados en la producción de grasa y proteína en leche (alto mérito genético y mérito genético promedio de Reino Unido). En el trabajo se encontró que el genotipo y el régimen de alimentación influyen en las emisiones de metano entérico de las vacas. Los autores reportaron que el grupo de vacas de alto mérito genético alimentadas con una dieta con bajo aporte de forraje fueron las que emitieron menos  $\text{CH}_4/\text{kg}$  de leche, mientras que el grupo de mérito genético control y alimentado con alta cantidad de forraje tuvieron los mayores valores de emisión de  $\text{CH}_4/\text{kg}$  de leche (12,2 gr/kg de leche vs. 18,5 gr/kg de leche). Los resultados del trabajo mostraron que la producción de  $\text{CH}_4/\text{kg}$  de leche fue menor en los grupos con dietas con bajo forraje independientemente del mérito genético y dentro del grupo con bajo forraje, las vacas de alto mérito fueron las que emitieron menos  $\text{CH}_4$ .

A su vez, en un estudio de análisis de ciclo de vida de cuatro sistemas diferentes de producción de leche, se encontró que animales de alto mérito genético manejados con dietas con bajo proporción de forraje en la dieta redujeron la intensidad de las emisiones de gases de efecto invernadero en un 24%, comparado con vacas del mérito genético control alimentadas con un alto nivel forraje en la dieta (Ross et al., 2014).

Yan et al. (2010), evaluaron las relaciones entre la producción de  $\text{CH}_4$ , la repartición de la energía y la eficiencia de utilización de la energía en vacas lecheras con RTM. Los autores demostraron que el  $\text{CH}_4$  como proporción de la ingesta de energía, aumentó con el incremento del gasto energético para mantenimiento y por la ineficiencia del uso de la energía metabolizable (EM) para la producción, mientras que se redujo con el incremento en la proporción de EM consumida dirigida a la producción de leche y reservas corporales. Por lo tanto, las vacas con una alta eficiencia en la utilización de la energía tienen una baja tasa de producción de  $\text{CH}_4$ .

Las emisiones de metano entérico pueden ser minimizadas cuando las vacas particionan la energía consumida hacia la producción de leche, dando como resultado una mejor eficiencia productiva, reduciendo la pérdida de energía metabolizable consumida (Bell et al., 2010). Así, las vacas lecheras de alta producción, con una mayor ingesta de alimento y por lo tanto producción de metano entérico, producen, sin embargo, menores cantidades de metano por kilogramo de leche (Chagunda et al. 2009).

Olijhoek et al. (2018), midieron las emisiones de  $\text{CH}_4$  en el genotipo Jersey y Holstein, utilizando cámaras respiratorias y alimentadas con una RTM. Los resultados demostraron que las vacas Jersey emitieron más  $\text{CH}_4/\text{kg}$  de MS y perdieron más  $\text{CH}_4$  como porcentaje de la EB consumida que las vacas Holstein, además que emitieron más  $\text{H}_2/\text{kg}$  de MS. La mayor producción de  $\text{CH}_4$  e  $\text{H}_2$  por kilo de alimento consumido, de las vacas Jersey, refleja una mayor producción de gas entérico en relación con la ingesta de alimento. Esto indica una fermentación más intensa en el rumen que favorece la producción de  $\text{H}_2$  más que su consumo, debido a una mayor digestibilidad de la materia orgánica y de la FDN y quizás, debido también, a una estructura de la comunidad microbiana entre las razas diferente. Sin embargo, Cersosimo et al. (2016) concluyó que vacas Holstein y Jersey tienen la misma



comunidad metanógena. Sus resultados indicaron una influencia de los días en leche y la dieta en la composición de la comunidad metanógena, pero no diferencias entre razas con la misma dieta.

El único trabajo encontrado que haya evaluado las emisiones de CH<sub>4</sub> entérico entre el genotipo Holstein proveniente de Estados Unidos y el proveniente de Nueva Zelanda fue el estudio realizado en Nueva Zelanda por Robertson y Waghorn (2002), donde se midieron las emisiones de CH<sub>4</sub> del genotipo Holstein de origen norteamericano y de el genotipo Holstein de origen neozelandés, en la lactancia temprana, media y tardía. Al mismo tiempo se evaluó el desempeño de cada genotipo en dietas contrastantes: 100% RTM vs. 100% pastoreo. Como resultado se encontró que el genotipo Holstein de origen norteamericano produjo entre 8 y 11% menos metano como porcentaje de la EB de la dieta que las vacas de origen neozelandés en la dieta de pastura y RTM, respectivamente. Además, se encontró una interacción genotipo x ambiente sobre la emisión de CH<sub>4</sub> ya que se observó un resultado diferente en la emisión de CH<sub>4</sub>/kg MS a través de la lactancia entera entre las vacas norteamericanas y las neozelandesas. La emisión de CH<sub>4</sub> en las norteamericanas incrementó a lo largo de toda la lactancia de 15,1 a 23,4 g/kg MS en la dieta pastoril y de 16,0 a 21,4 g/kg MS en la RTM. Esto contrasta con el mayor valor inicial, pero menos variación, de las vacas neozelandesas dónde en la dieta pastoril el incremento en la emisión de CH<sub>4</sub> en la lactancia entera fue de 18,8 a 23,8 g/kg MS y de 20,3 a 22,3 en la RTM. Los autores explican la menor emisión encontrada en las vacas norteamericanas, por una mayor eficiencia de alimentación asociado a un animal más grande y con un mayor peso de bocado, comparado con el animal más chico. Además, varios autores reportaron que vacas Holstein de origen norteamericano son más eficientes y tienen un mejor desempeño que vacas neozelandesas cuando se las alimenta con RTM (Kolver et al. 2002; Thorne y Jago, 2003).

Con todo esto, es necesario contar con más experimentos que comparen distintos genotipos y los distintos tipos de dieta, considerando la variabilidad intrínseca entre animales (aún dentro del mismo biotipo) y dentro de cada uno de los tipos de dieta. Consecuentemente, es de interés conocer si existen diferencias en las emisiones de los genotipos lecheros utilizados en los establecimientos de producción de leche de Uruguay.

## **Capítulo 3. Hipótesis y Objetivos**

### **3.1 Hipótesis**

Un alto nivel de inclusión de pastura en la dieta de vacas lecheras aumenta la emisión de metano entérico en proporción a la energía bruta consumida ( $Y_m$ ), siendo la magnitud de esta emisión menor en vacas Holstein de origen genético norteamericano que en las de origen neozelandés.

### **3.2 Objetivos**

#### **3.2.1 Objetivo General**

Estudiar los efectos de distintas estrategias de alimentación, basadas en el nivel de inclusión de pasturas, así como de distinto origen genético de vacas lecheras sobre las emisiones de metano entérico.

#### **3.2.2 Objetivos Específicos**

- Evaluar el efecto de la estrategia de alimentación, en cuanto al nivel de pastura en la dieta, sobre el consumo y la digestión así como en las emisiones de  $CH_4$ .
- Evaluar el efecto del origen genético (Holstein de origen norteamericano vs. Holstein de origen neozelandés) en las emisiones de  $CH_4$ .
- Contribuir al establecimiento de los factores de emisión ( $Y_m$ ) en Uruguay.

## **Capítulo 4. Materiales y Métodos**

### **4.1 Lugar y entorno experimental**

El trabajo experimental se llevó a cabo en la Unidad de Lechería del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA, La Estanzuela), situado en ruta 50 km 11, departamento de Colonia, República Oriental del Uruguay (34° 20' S, 57° 41' W; 81 m.s.n.m) durante el mes de octubre de 2018.

Durante el experimento la temperatura media del período fue de 15,8°C y la lluvia acumulada fue de 20 mm. El promedio de temperatura y precipitaciones de los últimos 10 años en el mismo período fue de 17,2°C y 74 mm, respectivamente.

Los procedimientos experimentales fueron realizados de acuerdo con los principios bioéticos y protocolos de supervisión propuestos por el Comité de Bioética del INIA-Uruguay.

Este estudio forma parte de un estudio mayor, de largo plazo, llevado a cabo en la Unidad de Lechería y denominado Proyecto 10-MIL. Dicho proyecto tuvo una duración de tres años, comenzó en agosto de 2017 y finaliza en agosto de 2020. El mismo evalúa 4 sistemas

de producción de leche, con iguales objetivos de producción y que se diferencian en la combinación de distintas estrategias de alimentación y origen genético de los animales. En cada uno de los tratamientos del Proyecto 10-MIL se utiliza un grupo de 30 vacas en ordeño que se encuentran bajo un mismo módulo en forma permanente durante todo el período de estudio.

Cada módulo fue asignado a una estrategia de alimentación: Pastura Fija o Pastura Máxima. Estas estrategias plantearon ofertar a las vacas la misma cantidad de nutrientes, pero difiriendo la forma de suministro entre las dos estrategias. Las dietas se formularon de acuerdo a los requerimientos del NRC (2001) para la producción de leche esperada según la curva fisiológica de Wood (1967).

La estrategia Pastura Fija (FixP) consistió en que la cantidad de pastura asignada a las vacas en producción fue restringida en un 33% de la dieta promedio anual. Luego del ordeño de la mañana a las vacas se les suministró, en pista de alimentación, alimento concentrado mezclado junto con las reservas; formando una RPM. Es importante mencionar que durante el ordeño las vacas bajo esta estrategia no fueron suplementadas. La dieta en primavera de 2018 consistió en 37% pastoreo directo, 35% reservas y 28% concentrado.

La estrategia Pastura Máxima (MaxP) consistió en que a las vacas se les ofreció la máxima cantidad de pastura (aproximadamente 60% de la dieta promedio anual), asignada en función del crecimiento de la plataforma de pastoreo del sistema del Proyecto 10-MIL. El concentrado se suministró en comederos individuales durante los dos ordeños. La dieta de primavera 2018 en estos grupos consistió en un promedio de 73% pastoreo directo y 27% concentrado.

Los genotipos utilizados fueron Holstein con más de 75% de genética de origen norteamericana (NAH) y Holstein con más de 75% de genética de origen neozelandés (NZH). El Índice Económico de Producción (IEP), descrito por Urioste et al. (2016), de las vacas utilizados en el presente trabajo es de 108 en las NAH y 120 para las NZH.

## **4.2 Diseño experimental**

Sobre la base de la estrategia diseñada para el Proyecto 10-MIL, de los 30 animales de cada módulo, el presente experimento se aplicó sobre 12 animales por tratamiento. Previamente fueron bloqueados por días de lactancia ( $136 \pm 26$  DEL), producción ( $32 \pm 5$  L/d), número de lactancia ( $3,2 \pm 0,9$ ) y peso vivo ( $572 \pm 40$  kg). Los tratamientos fueron:

- 1) Pastura Fija - Holstein de origen norteamericano (FixP NAH);
- 2) Pastura Máxima - Holstein de origen norteamericano (MaxP NAH)
- 3) Pastura Máxima-Holstein de origen neozelandés (MaxP NZH).

Los tratamientos Pastura Máxima tuvieron dos turnos de pastoreo, el primer turno, de 8 horas, fue entre las 6.00 am y las 2.00 pm. Luego, las vacas fueron ordeñadas y después del ordeño de la tarde comenzó el segundo turno de pastoreo desde las 3.30 pm hasta las 4.00 am con 12 horas y media de duración. Durante cada ordeño se suministraba a cada vaca un concentrado comercial en comederos individuales. En cuanto al tratamiento Pastura Fija, tuvo un sólo turno de pastoreo, de 12 horas y media de duración, luego del ordeño de la tarde. Después del ordeño de la mañana, desde las 6.00 am hasta las 2.00 pm, las vacas eran alimentadas con RPM en comederos individuales, previamente acostumbradas.

El estudio comenzó el 3 de octubre y finalizó el 24 de octubre del 2018. Los primeros ocho días fueron de acostumbamiento al ensayo, seguidos por dos períodos de mediciones de cinco días cada uno. Un intervalo de tres días entre períodos fue utilizado para la preparación de materiales a utilizar en el segundo período de mediciones. Durante el intervalo de tres días los animales siguieron juntos bajo los mismos tratamientos. Durante el período pre experimental, las vacas ya se encontraban dentro de los tratamientos correspondientes.

En cuanto al peso vivo promedio de las vacas al comenzar el estudio este fue de 612, 564 y 542 kg para las vacas del tratamiento FixP NAH, MaxP NAH y MaxP NZH, respectivamente.

### 4.3 Alimentación, Manejo del Pastoreo y Análisis de los Alimentos

En cuanto a la alimentación, la RPM consistió en una mezcla de silo de maíz, silopack de pradera, harina de soja, maíz, afrechillo de trigo, bicarbonato de sodio, óxido de magnesio, urea y núcleo vitamínico mineral (Tabla I). La composición nutricional promedio de los dos períodos de mediciones tanto de la RPM, del concentrado comercial suministrado a los grupos MaxP y de las pasturas de cada tratamiento se presentan en la Tabla II. La relación forraje concentrado de los tres tratamientos fue 72/28.

La cantidad promedio de RPM ofertada a las vacas en FixP durante los dos períodos de mediciones fue de 12,5 kg de MS por vaca por día. En cuanto a las vacas en MaxP, a las NAH se les ofertó 6,4 kg de MS de concentrado por día y a las NZH 5,6 kg de MS por día.

Tabla I. Ingredientes de la ración parcialmente mezclada (RPM).

| Ingrediente               | % de la MS |
|---------------------------|------------|
| Silo de Maíz              | 28,2       |
| Silopack de pradera       | 26,8       |
| Harina de Soja            | 12,1       |
| Maíz                      | 17,2       |
| Afrechillo de Trigo       | 12,7       |
| Bicarbonato de Sodio      | 0,93       |
| Óxido de Magnesio         | 0,65       |
| Urea                      | 0,59       |
| Núcleo Vitamínico Mineral | 0,56       |
| Fosfato bicálcico         | 0,29       |

Con respecto al pastoreo, en cada grupo se realizaban franjas diarias de una pradera mezcla de *Medicago sativa* y *Dactylis glomerata*, el área de pastoreo total fue de 5 ha. Dentro del grupo de vacas NAH bajo la estrategia de Pastura Máxima, del total de los pastoreos durante el período experimental, un 30% fue de *Festuca arundinacea*.

La disponibilidad de la pastura se determinó semanalmente, dentro del Proyecto 10-MIL, a través de un medidor de altura CDax (C-Dax Ltd, Palmerston North, Nueva Zelanda) utilizando ecuaciones previamente calibradas para esas pasturas (Waller et al., 2017). La tasa de crecimiento de la pastura fue calculada por la diferencia de disponibilidad de la pastura (kg MS/há) entre una semana y la siguiente. El área de pastoreo para cada tratamiento fue asignada según el crecimiento esperado y con un objetivo de altura post-pastoreo de 5 cm y entre un 15 a 20% de área de matas de rechazo para todos los tratamientos.

El consumo objetivo de pastura de las vacas en cada tratamiento durante los dos períodos de mediciones fue 8,8 kg MS/vacas/día en FixP NAH, 17,4 kg MS/vacas/día en MaxP NAH y 15,2 kg MS/vacas/día en MaxP NZH.

Muestras representativas de la pastura a una altura mayor a 5 cm fueron tomadas antes del ingreso de las vacas a la parcela. Luego, se conformó una muestra compuesta de la pastura en cada tratamiento y período para su posterior análisis de composición química. Además, muestras de la RPM y del concentrado ofertado fueron colectadas diariamente durante los dos períodos de mediciones. Las muestras de cada alimento fueron combinadas para crear una muestra compuesta de los cinco días en cada período. Durante las mediciones el rechazo individual tanto de RPM como de concentrado fue menor al 10% por lo que no se tomó muestra del rechazo para realizar análisis químico.

Tabla II. Composición química promedio de los dos períodos de mediciones del concentrado, ración parcialmente mezclada (RPM) y las pasturas ofrecidas a cada uno de los tratamientos.

| Ítem                          | Concentrado | RPM  | Pastura               |                       |                        |
|-------------------------------|-------------|------|-----------------------|-----------------------|------------------------|
|                               |             |      | FixP NAH <sup>8</sup> | MaxP NAH <sup>9</sup> | MaxP NZH <sup>10</sup> |
| MS <sup>1</sup> , g/kg fresco | 836         | 502  | 194                   | 186                   | 188                    |
| Composición química, g/kg MS  |             |      |                       |                       |                        |
| MO <sup>2</sup>               | 922         | 921  | 887                   | 887                   | 881                    |
| Extracto Etéreo               | 30          | 25   | 28                    | 30                    | 33                     |
| FDN <sup>3</sup>              | 288         | 437  | 561                   | 542                   | 586                    |
| FDA <sup>4</sup>              | 84          | 178  | 222                   | 242                   | 232                    |
| LAD <sup>5</sup>              | 57          | 35   | 49                    | 54                    | 55                     |
| Almidón                       | 398         | 303  | -                     | -                     | -                      |
| PC <sup>6</sup>               | 179         | 144  | 171                   | 173                   | 169                    |
| EB <sup>7</sup> (Mcal/kg)     | 4,47        | 4,68 | 4,65                  | 4,40                  | 4,07                   |

<sup>1</sup>MS= materia seca; <sup>2</sup>MO=materia orgánica; <sup>3</sup>FDN= fibra detergente neutro; <sup>4</sup>FDA= fibra detergente ácido; <sup>5</sup>LAD=lignina; <sup>6</sup>PC=proteína cruda; <sup>7</sup>EB=energía bruta; <sup>8</sup>FixPNAH=Pastura Fija vaca de origen norteamericana; <sup>9</sup>MaxPNAH= Pastura Máxima vaca de origen norteamericana; <sup>10</sup>MaxPNZH= Pastura Máxima vaca de origen neozelandés

Primeramente, todas las muestras de alimentos fueron secadas post-muestreo a 60°C por 48 h, luego fueron molidas a 1 mm y almacenadas hasta realizar los análisis en el Laboratorio de Nutrición Animal de INIA La Estanzuela. El contenido de materia seca (MS) se determinó secando las muestras a 105°C por 24 h (método 934.01; AOAC, 1990). A su vez, el contenido de cenizas fue cuantificado colocando las muestras en una mufla por 2 h

a 600°C (método 942.05; AOAC, 1990) y el contenido de materia orgánica (MO) fue determinado como la diferencia entre MS y cenizas. Asimismo, el contenido de nitrógeno fue analizado acorde al método Kjeldahl (método 984.13; AOAC, 1990) y multiplicando por 6,25 para obtener el valor de proteína bruta de la muestra. Además, se realizaron análisis de extracto etéreo de acuerdo con el método 920.39 (AOAC, 1990).

Las muestras fueron también analizadas para determinar su contenido de fibra detergente neutro (FDN) y fibra detergente ácido (FDA) a través del uso de un analizador de fibra Ankom (Ankom Technology Corporation, NY). El procedimiento utilizado fue el descrito por Van Soest et al. (1991) y excluyendo la ceniza residual. A las muestras de concentrado y RPM se les realizó el análisis de FDN con sulfito de sodio y  $\alpha$  amilasa estable al calor, mientras que las muestras de pastura fueron analizadas solo con sulfito de sodio. A su vez, analizó el contenido de lignina (LAD) según método 973.18; AOAC, (1990).

La concentración de almidón de las muestras de concentrado y RPM se determinó utilizando un kit comercial Total Starch Megazyme (método 996.11; AOAC). El valor de energía bruta (EB) de los alimentos fue determinado mediante bomba calorimétrica (Autobomb Gallenkamp; Loughborough, Leics, United Kingdom) en el Laboratorio de Nutrición Animal de Facultad de Agronomía.

#### **4.4 Determinación del Consumo de Materia Seca y Digestibilidad Aparente de la Dieta**

Con respecto al consumo de materia seca de concentrado y de RPM, estos fueron calculados por la diferencia entre lo ofertado y lo rechazado cada día durante los dos períodos de mediciones. Por otra parte, el consumo de materia seca de la pastura fue estimado individualmente utilizando dióxido de titanio (TiO<sub>2</sub>) y por determinación de la fibra detergente neutro indigestible (FDNi).

El TiO<sub>2</sub> se utilizó como marcador externo para obtener la producción diaria de heces (PH) y se prosiguió de la forma descrita por Titgemeyer et al. (2001) y Glindemann et al. (2009). Para ello, se suministraron 10 gr de TiO<sub>2</sub> por vaca por día durante los dos períodos de mediciones (en simultaneo al momento de cuantificar la emisión de CH<sub>4</sub>), y por 5 días previos para lograr el equilibrio entre la ingesta y la excreción de TiO<sub>2</sub>. Durante el intervalo de 3 días también se continuó con la dosificación de TiO<sub>2</sub>. A su vez, la FDNi se utiliza como marcador interno para la estimación de la digestibilidad aparente de los nutrientes en todo el tracto digestivo según Huhtanen et al. (1994).

Para la determinación de la PH, dos veces al día, luego de cada ordeñe y durante los dos períodos de mediciones, se colectaron directamente del recto de cada vaca dos muestras de heces (100 g). Además, durante dos días seguidos, en cada período las muestras de heces también se utilizaron para determinar FDNi. Todas las muestras fueron inmediatamente secadas a 60°C durante 72 h y molidas a 1 mm para su posterior análisis.

Luego, a nivel de laboratorio, la concentración de TiO<sub>2</sub> en heces se determinó según el método de Myers et al. (2003), para ello se conformó una muestra compuesta por vaca por período. Las muestras de heces fueron analizadas también para determinar MS, cenizas, MO, FDN y FDA como se describió previamente.

En relación con la determinación de FDNi, muestras compuestas de pastura, concentrado, RPM y heces fueron molidas a 1 mm y 0,5 gr de muestra fueron pesadas y colocadas en bolsas F57 Ankom de 25  $\mu$ m (Ankom Technology, Macedon, NY). Las mismas fueron

incubadas por 288 h consecutivas en el rumen (Bender et al., 2016) de dos vacas no lactantes, con fistula ruminal, alimentadas con una dieta que consistió en 74,6% silopack de alfalfa; 10,9% grano de maíz; 3,6% harina de soja y 10,9% cáscara de soja. Las bolsas F57 se colocaron dentro de una bolsa de tamaño mayor con una cadena para que las bolsas lleguen al saco ventral del rumen. Luego de incubadas las bolsas se lavaron y secaron por 72 h a 60°C, posteriormente el residuo se analizó para determinación de FDN con sulfito de sodio como se describió previamente y excluyendo la ceniza residual.

El consumo de pastura se calculó con la ecuación de Cabral et al. (2014):  $CMS_{pastura} (kg/d) = [(PH (kg MS/d) * FDNi_{heces} (kg MS/d)) - (FDNi_{concentrado} o RPM (kg MS/d) * consumo de concentrado o RPM)] / FDNi_{pastura} (kg MS/d)$ . Los coeficientes de digestibilidad aparente total del tracto para MS, MO, FDN y FDA fueron calculados como:  $[ingestión (g/d) - excreción fecal (g/d) / ingestión (g/d)] * 100$ .

El consumo de materia seca total fue calculado como la suma del consumo de materia seca de pastura estimado más el consumo de concentrado medido en las vacas en el tratamiento Máxima Pastura o más el consumo de RPM medido en el tratamiento Pastura Fija.

#### **4.5 Producción y Composición de la Leche**

Las vacas fueron ordeñadas dos veces al día, a las 04.00 am y a las 03.00 pm. La producción de leche individual se registró automáticamente (Dairy Plan, GEA Farm Technologies, Alemania) en todos los ordeños durante todo el estudio. Asimismo, durante tres días, en cada período, se tomaron muestras individuales de leche con conservante y representativas de cada ordeño. Las muestras fueron analizadas en el Laboratorio de Calidad de Leche de INIA La Estanzuela, para determinación de grasa, proteína y lactosa mediante espectroscopía infrarroja (Milkoscan® Foss FT 2).

En cuanto al valor de leche corregida por grasa 4%, se calculó utilizando la fórmula descrita en el NRC, (2001):  $LCG 4\% = (0,4 * Producción de leche) + [15 * (porcentaje de grasa en leche / 100) * Producción de leche]$ .

#### **4.6 Medición de Metano Entérico**

La emisión de metano entérico se cuantificó utilizando la técnica del trazador hexafluoruro de azufre (SF<sub>6</sub>) (Johnson et al., 1994) adaptada por Gere y Gratton (2010). Las mediciones se realizaron durante dos períodos de cinco días cada uno, con un acostumbamiento previo.

Primeramente, ocho días antes de comenzar con las mediciones, a cada animal se le suministró un tubo de permeación relleno de SF<sub>6</sub> como indicador de la emisión de gas. Estos tubos se suministraron utilizando un lanza-bolos comercial y previamente fueron calibrados durante 14 semanas a baño maría a 39°C. Para ello, se realizaron tres pesadas semanales a la misma hora para obtener la tasa de liberación de SF<sub>6</sub> (TL) de cada tubo y la curva de regresión lineal ( $R^2 > 0,999$ ).

Luego, los tubos fueron bloqueados según su TL, para adjudicarlos a los animales, y se asignaron aleatoriamente a los bloques de cada tratamiento (Pinares-Patiño et al., 2008). La media y desvío estándar de la TL fue de  $3,7 \pm 1,7$  mg/d.

En cuanto a la colecta del gas exhalado y eructado, esta se realizó colocando a cada animal un bozal con dos colectores de acero inoxidable de 0,5 L. Los mismos permanecieron en los animales durante cinco días continuos para la realización del muestreo de cada período. Previo a colocarlos, los colectores fueron vaciados a una presión de 0,5 mbar y después de las 48 h se midió la presión para comprobar la estanqueidad. Además, antes de su colocación en los animales, los colectores se limpiaron dos veces con gas nitrógeno (N<sub>2</sub>) de alta pureza, para evitar cualquier contaminación posible, hasta una presión de 1500 mbar y finalmente fueron evacuados nuevamente hasta llegar a 0,5 mbar.

Con respecto a la regulación de la entrada de aire, la misma se ajustó utilizando reguladores de aire tipo bolilla que fueron calibrados previo al comienzo del experimento con una bomba de vacío y un vacuómetro de tipo Pirani. La calibración se realizó para obtener un vacío, al final de cada período de mediciones, de entre 400 y 600 mbar de presión en cada tubo colector acorde a Gere y Gratton (2010). Los reguladores fueron colocados justo encima de las fosas nasales de los animales e incluían un doble filtro para protegerlos contra el agua y el polvo.

En el lugar donde las vacas de FixP consumían la RPM y en la parcela donde las vacas de los tres tratamientos pastoreaban se colocó un tubo colector para obtener los valores ambientales de SF<sub>6</sub> y CH<sub>4</sub>. Estos, luego se utilizaron para hacer las correcciones en el cálculo del CH<sub>4</sub> emitido. A su vez, un animal extra de cada tratamiento fue utilizado como control de la concentración de SF<sub>6</sub> del aire exhalado, por lo tanto, a estos animales se les colocó el bozal con los tubos colectores, pero no se les suministró el tubo de permeación de SF<sub>6</sub>. La concentración de SF<sub>6</sub> que se obtuvo de los animales control se utilizó como referencia para el valor de SF<sub>6</sub>, ya que la concentración de SF<sub>6</sub> de los animales con tubo de permeación tenía que ser mayor al de los animales control.

Por último, al final de cada período de medición se quitaron los colectores de los animales y se midió la presión post-muestreo. Luego, las muestras en los tubos se diluyeron con nitrógeno y se les midió la presión final. De cada colector se extrajeron tres submuestras y a una de ellas se utilizó para determinar la concentración de CH<sub>4</sub> y SF<sub>6</sub> mediante cromatografía de gases (Agilent 7890 A, Santa Clara, CA). Para ello se empleó un detector de flama ionizante (250°C) para CH<sub>4</sub> y un detector de captura de electrón (300°C) para SF<sub>6</sub>. Se utilizaron cuatro estándares de CH<sub>4</sub> y dos de SF<sub>6</sub> para calibrar el cromatógrafo y tener una curva de calibración en un rango de 0,52 a 50 partes por millón (ppm) de CH<sub>4</sub> y de 76 a 130 partes por trillón (ppt) de SF<sub>6</sub>.

La emisión de CH<sub>4</sub> entérico de cada animal fue calculada utilizando la TL de cada tubo de SF<sub>6</sub> y con la concentración de CH<sub>4</sub> y la de SF<sub>6</sub> del ambiente (en ppm y ppt respectivamente), con la siguiente ecuación:

$$CH_4 \text{ (g/d)} = TL \text{ SF}_6 \text{ (g/d)} * \frac{[CH_4M] - [CH_4A]}{[SF_6M] - [SF_6A]} * \frac{PM \text{ CH}_4}{PM \text{ SF}_6} * 1000$$

dónde: TL SF<sub>6</sub> es la tasa de liberación de SF<sub>6</sub> del tubo de permeación, [CH<sub>4</sub>M] y [SF<sub>6</sub>M] son las concentraciones de estos gases (en ppm y ppt, respectivamente) en las muestras de los animales. [CH<sub>4</sub>A] y [SF<sub>6</sub>A] son las concentraciones de estos gases en las muestras ambientales. PM CH<sub>4</sub> y PM SF<sub>6</sub> son los pesos moleculares correspondientes a cada gas.

En los animales que se contaba con dos tubos, se utilizó el valor promedio de la concentración de CH<sub>4</sub> y SF<sub>6</sub> de cada tubo.



#### 4.7 Extracción y Análisis de Líquido Ruminal

Muestras de líquido ruminal fueron extraídas de cada vaca mediante sonda esofágica conectada a una bomba de vacío (Steiner et al., 2015) al día cinco de cada período y luego del ordeño de la tarde. Los primeros 150 mL se descartaron por posible contaminación con saliva. Inmediatamente de la colecta se midió el valor de pH del líquido ruminal utilizando un pHmetro digital previamente calibrado. Luego, dos muestras de 0,5 mL de líquido ruminal se conservaron en tubos Eppendorf de 2 mL con 0,5 mL de HClO<sub>4</sub> 0,1 M para realizar análisis de AGV y otras dos muestras con 1 mL de líquido ruminal se conservaron en 0,02 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 50% (v/v) para analizar N-NH<sub>3</sub>. Todas las muestras se guardaron a -20°C hasta su análisis.

El análisis de N-NH<sub>3</sub> se realizó mediante colorimetría ajustado a 625 nm según técnica de Weatherburn (1967). Mientras que el análisis de AGV se realizó utilizando un HPLC (Dionex Ultimate 3000, Sunnyvale, CA), según la técnica descrita por Adams et al. (1984). Ambos análisis fueron realizados en el Instituto de Producción Animal Veterinaria (IPAV), de Facultad de Veterinaria, Universidad de la República (UdelaR).

La concentración de ácido acético, propiónico y butírico se reportan como proporción molar. La concentración total de AGV es la suma de la concentración de ácido acético, propiónico y butírico.

#### 4.8 Análisis Estadístico

Los datos fueron analizados mediante análisis de varianza utilizando el software SAS Studio (University Edition, SAS Institute, Inc., Cary, NC). El consumo de materia seca, la digestibilidad, la emisión de CH<sub>4</sub> y los parámetros del líquido ruminal fueron analizados utilizando el procedimiento PROC MIXED del SAS acorde al siguiente modelo y con al animal como unidad experimental:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + B_j + P_k + \varepsilon_{ijk}$$

donde  $Y_i$  es la variable dependiente,  $\mu$  es la media general,  $T_i$  es el efecto fijo del tratamiento (FixP NAH; MaxP NAH; MaxP NZH),  $B_j$  es el efecto del bloque (1 a 12),  $P_k$  es el efecto del período (1 y 2) y  $\varepsilon_{ijk}$  el error residual. El bloque y el período fueron incluidos como efectos aleatorios.

En cuanto a producción de leche y su composición química, estas fueron analizadas como medidas repetidas en el tiempo, con la vaca como medida repetida. Para las variables porcentaje de grasa y de lactosa, muestreadas con heterogeneidad (intervalos de tiempo desiguales) en ambos períodos experimentales y cuyos residuos tuvieron distribución normal, fueron analizadas utilizando estructura de covarianza ARH (1). También se utilizó esta estructura para porcentaje de proteína, pero previamente los datos se transformaron a logaritmo en base 10 ya que el residuo no se distribuyó normalmente. Para el resto de las variables de composición química de la leche se utilizó la estructura de AR (1). El modelo utilizado fue el mismo que se describió anteriormente.

El test de normalidad y la normalidad del residuo se realizó en todas las variables (Shapiro and Wilk, 1965) mediante el PROC UNIVARIATE.

Las medias de cada variable fueron comparadas mediante test de Tukey y fueron considerados diferentes cuando  $P \leq 0,05$  y tendieron a ser diferentes si  $0,05 \leq P \leq 0,10$ .

## Capítulo 5. Resultados

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos para cada variable estudiada, dividiéndose en cuatro partes. En primer lugar se comentan los datos de consumo y digestibilidad aparente de la dieta. Segundo, los datos de producción y composición de la leche. Luego se presentan los datos de emisión de metano y la intensidad de la emisión para cada tratamiento y por último se muestran los resultados de los parámetros ruminales.

### **Consumo y Digestibilidad Aparente:**

En la Tabla III se presentan los datos relacionados a consumo, donde se puede ver que el consumo total de materia seca de las vacas NAH con distinta estrategia de alimentación no fue diferente (17,1 kg de MS;  $P>0,1$ ). En cuanto al consumo de pastura, este fue mayor ( $P<0,05$ ) en las vacas bajo la estrategia de alimentación MaxP (11,9 vs. 4,7 kg de MS).

Tabla III. Consumo de materia seca y de nutrientes en vacas Holstein norteamericanas (NAH) y neozelandesas (NZH) bajo una estrategia de alimentación con pastura fija (FixP) y con pastura máxima (MaxP).

| Ítem                    | Tratamientos       |                    |                    | EEM   | P      |
|-------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|-------|--------|
|                         | FixP<br>NAH        | MaxP<br>NAH        | MaxP<br>NZH        |       |        |
| CMS <sup>1</sup> , kg/d |                    |                    |                    |       |        |
| Pastura                 | 4,7 <sup>c</sup>   | 11,9 <sup>a</sup>  | 9,2 <sup>b</sup>   | 0,67  | <0,001 |
| Concentrado             | -                  | 5,2 <sup>a</sup>   | 4,5 <sup>b</sup>   | 0,06  | <0,001 |
| RPM <sup>2</sup>        | 12,4               | -                  | -                  | 0,07  | -      |
| Total                   | 17,1 <sup>a</sup>  | 17,1 <sup>a</sup>  | 13,7 <sup>b</sup>  | 0,60  | <0,001 |
| Consumo, kg/d           |                    |                    |                    |       |        |
| MO <sup>3</sup>         | 15,6 <sup>a</sup>  | 15,3 <sup>a</sup>  | 12,2 <sup>b</sup>  | 0,46  | <0,001 |
| FDN <sup>4</sup>        | 8,1 <sup>a</sup>   | 7,9 <sup>a</sup>   | 6,7 <sup>b</sup>   | 0,37  | <0,001 |
| FDA <sup>5</sup>        | 3,3 <sup>a</sup>   | 3,3 <sup>a</sup>   | 2,5 <sup>b</sup>   | 0,17  | <0,001 |
| Proteína                | 2,6 <sup>b</sup>   | 3,0 <sup>a</sup>   | 2,4 <sup>c</sup>   | 0,12  | <0,001 |
| Almidón                 | 3,8 <sup>a</sup>   | 2,1 <sup>b</sup>   | 1,8 <sup>c</sup>   | 0,03  | <0,001 |
| Energía Bruta, MJ/d     | 334,1 <sup>a</sup> | 317,2 <sup>a</sup> | 240,9 <sup>b</sup> | 12,70 | <0,001 |

Tratamientos: FixP= Pastura Fija (37% pastoreo directo después del ordeño p. m. y hasta el ordeño de a. m. y 63% RPM en pista de alimentación entre el ordeño a. m. y p. m.), MaxP= Pastura Máxima (73% pastoreo directo durante dos turnos y 27% concentrado suministrado durante cada ordeño), NAH=vacas Holstein de origen norteamericano, NZH= vaca Holstein de origen neozelandés

<sup>a,b,c</sup> indica diferencias significativas ( $P<0,05$ )

<sup>1</sup>CMS: consumo de materia seca

<sup>2</sup>RPM: ración parcialmente mezclada

<sup>3</sup>MO: materia orgánica

<sup>4</sup>FDN: fibra detergente neutro

<sup>5</sup>FDA: fibra detergente ácido

El consumo de MO, FDN, FDA y EB no presentó diferencias significativas ( $P>0,1$ ) entre las dos estrategias de alimentación, pero sí existieron diferencias en el consumo de proteína que fue mayor para las vacas en MaxP que en FixP ( $P<0,05$ ) y en el consumo de almidón que fue mayor en las vacas en FixP ( $P<0,05$ ).

Dentro de la misma estrategia de alimentación (Pastura Máxima), las vacas de diferente origen genético presentaron diferencias en el consumo. Las vacas NAH tuvieron mayor consumo total de materia seca que las NZH (17,1 vs. 13,7 kg de MS;  $P<0,05$ ). Esta diferencia se explica por la mayor oferta que tuvieron y por ende también al mayor consumo de concentrado (5,2 vs. 4,5 kg MS,  $P<0,05$ ) como de pastura (11,9 vs. 9,2 kg MS,  $P<0,05$ ) en las vacas NAH respecto a las NZH. Asimismo, las vacas NAH tuvieron mayor consumo ( $P<0,05$ ) de todos los nutrientes que las vacas NZH.

Con respecto a los datos de digestibilidad (Tabla IV), se encontró que tanto la digestibilidad de la MS como de la MO fue diferente ( $P<0,05$ ) entre las estrategias de alimentación. Las vacas bajo una estrategia de Pastura Fija tuvieron 2 y 2,2 puntos porcentuales más de digestibilidad de la MS y de la materia orgánica respectivamente que las vacas en la estrategia de Pastura Máxima ( $P<0,05$ ). En la digestibilidad de la FDN y la digestibilidad de la FDA no se encontraron diferencias ( $P>0,1$ ) entre las estrategias.

Entre los orígenes genéticos, se puede ver que las norteamericanas tuvieron mayor digestibilidad de la MS, de la MO y de la FDA ( $P<0,05$ ) que las vacas neozelandesas. Sin embargo, la digestibilidad de la FDN tampoco fue diferente entre los orígenes genéticos ( $P>0,1$ ).

Tabla IV. Digestibilidad aparente total del tracto digestivo de vacas Holstein norteamericanas (NAH) y neozelandesas (NZH) bajo una estrategia de alimentación con pastura fija (FixP) y con pastura máxima (MaxP).

| Ítem             | Tratamientos      |                   |                   | EMM  | P      |
|------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------|--------|
|                  | FixP              | MaxP              | MaxP              |      |        |
|                  | NAH               | NAH               | NZH               |      |        |
| Digestibilidad % |                   |                   |                   |      |        |
| MS <sup>1</sup>  | 70,5 <sup>a</sup> | 68,5 <sup>b</sup> | 67,2 <sup>c</sup> | 0,50 | <0,001 |
| MO <sup>2</sup>  | 70,2 <sup>a</sup> | 68,0 <sup>b</sup> | 66,9 <sup>c</sup> | 0,59 | <0,001 |
| FDN <sup>3</sup> | 68,1              | 66,0              | 66,4              | 1,05 | 0,129  |
| FDA <sup>4</sup> | 55,1 <sup>a</sup> | 53,2 <sup>a</sup> | 48,7 <sup>b</sup> | 1,24 | <0,001 |

Tratamientos: FixP= Pastura Fija (37% pastoreo directo después del ordeño p. m. y hasta el ordeño de a. m. y 63% RPM en pista de alimentación entre el ordeño a. m. y p. m.), MaxP= Pastura Máxima (73% pastoreo directo durante dos turnos y 27% concentrado suministrado durante cada ordeño), NAH=vacas Holstein de origen norteamericano. NZH= vaca Holstein de origen neozelandés

<sup>a,b,c</sup> indica diferencias significativas ( $P<0,05$ )

<sup>1</sup>MS: materia seca

<sup>2</sup>MO: materia orgánica

<sup>3</sup>FDN: fibra detergente neutro

<sup>4</sup>FDA: fibra detergente ácido

### Producción y Composición de la Leche:

La producción de leche (Tabla V) fue mayor en las vacas bajo la estrategia MaxP que en FixP (29,0 vs. 26,6 kg/d;  $P<0,05$ ). Sin embargo, la leche corregida al 4% de grasa, producción de proteína, producción de grasa, producción de lactosa y la producción de sólidos no tuvieron diferencias entre los tratamientos ( $P>0,1$ ).

La concentración de grasa, proteína y lactosa en leche fueron mayores en la estrategia FixP que en las vacas NAH en MaxP ( $P<0,05$ ).

Dentro de la estrategia de máxima pastura, la producción de leche fue mayor en las vacas NAH que en las NZH (29,0 vs. 23,0 kg/d;  $P<0,05$ ). A su vez, la producción de LCG 4%, producción de grasa, producción de lactosa y producción de sólidos fue mayor en las vacas NAH en MaxP que en las vacas NZH ( $P<0,05$ ).

Las vacas NZH tuvieron mayor concentración de grasa que las vacas NAH en MaxP, pero igual que en las vacas NAH en FixP ( $P<0,05$ ). Las neozelandesas también tuvieron mayor concentración de proteína que las vacas NAH en ambas estrategias de alimentación ( $P<0,05$ ). Sin embargo, la concentración de lactosa fue igual entre las vacas NZH y NAH bajo la estrategia MaxP, pero menor que las vacas NAH en pastura fija.

Tabla V. Producción y composición de leche de vacas Holstein norteamericana (NAH) y neozelandesa (NZH) bajo una estrategia de alimentación con pastura fija (FixP) y con pastura máxima (MaxP).

| Ítem                        | Tratamientos      |                   |                   | EEM   | P      |
|-----------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------|--------|
|                             | FixP<br>NAH       | MaxP<br>NAH       | MaxP<br>NZH       |       |        |
| Producción de leche, kg/d   | 26,6 <sup>b</sup> | 29,0 <sup>a</sup> | 23,0 <sup>c</sup> | 0,79  | <0,001 |
| Leche Corregida al 4%, kg/d | 29,4 <sup>a</sup> | 29,5 <sup>a</sup> | 25,1 <sup>b</sup> | 0,93  | <0,001 |
| Concentración, %            |                   |                   |                   |       |        |
| Grasa                       | 4,7 <sup>a</sup>  | 4,1 <sup>b</sup>  | 4,6 <sup>a</sup>  | 0,12  | <0,001 |
| Proteína                    | 3,4               | 3,2               | 3,6               | -     | -      |
| Proteína, log10             | 1,47 <sup>b</sup> | 1,43 <sup>c</sup> | 1,52 <sup>a</sup> | 0,011 | <0,001 |
| Lactosa                     | 4,8 <sup>a</sup>  | 4,7 <sup>b</sup>  | 4,7 <sup>b</sup>  | 0,04  | <0,001 |
| Producción, g/d             |                   |                   |                   |       |        |
| Grasa                       | 1251 <sup>a</sup> | 1189 <sup>a</sup> | 1057 <sup>b</sup> | 45,0  | <0,001 |
| Proteína                    | 895 <sup>a</sup>  | 924 <sup>a</sup>  | 827 <sup>ab</sup> | 27,0  | 0,002  |
| Lactosa                     | 1293 <sup>a</sup> | 1365 <sup>a</sup> | 1085 <sup>b</sup> | 42,0  | <0,001 |
| Sólidos <sup>1</sup> , kg/d | 3,4 <sup>a</sup>  | 3,5 <sup>a</sup>  | 3,0 <sup>b</sup>  | 0,10  | <0,001 |

Tratamientos: FixP= Pastura Fija (37% pastoreo directo después del ordeño p. m. y hasta el ordeño de a. m. y 63% RPM en pista de alimentación entre el ordeño a. m. y p. m.), MaxP= Pastura Máxima (73% pastoreo directo durante dos turnos y 27% concentrado suministrado durante cada ordeño), NAH=vacas Holstein de origen norteamericano, NZH= vaca Holstein de origen neozelandés

<sup>a,b,c</sup> indica diferencias significativas ( $P<0,05$ ). <sup>x,y</sup> indica tendencias ( $P<0,1$ )

<sup>1</sup>Producción de sólidos: producción de grasa + producción de proteína + producción de lactosa

### **Emisión de Metano Entérico:**

En relación con la emisión de metano, cabe mencionar que del total de los colectores utilizados (94 colectores) el 8% se perdió durante los períodos de mediciones. Las pérdidas ocurrieron porque algunos colectores se desprendieron del bozal y otros porque la conexión con el regulador de aire se desprendió. A su vez, el 22% de los tubos no se analizaron porque la presión post muestreo se encontraba fuera del rango aceptable.

De los 12 animales iniciales que se contaba en cada tratamiento en cada período, el análisis estadístico, para los resultados de metano, se realizó con un n promedio entre los dos períodos de: 6 para el tratamiento FixP NAH, 7 para MaxP NAH y 7 para MaxP NZH.

Con respecto a los resultados obtenidos y presentados en la Tabla VI, la emisión de metano total fue de  $281 \pm 28,8$  g/d, sin encontrarse diferencias ( $P>0,1$ ) entre las vacas bajo distintas estrategias de alimentación ni entre origen genético.

La emisión de metano por kg de materia seca consumida, kg de FDN, kg de LCG 4%, kg de sólidos en leche y Ym no fue diferente entre las vacas en FixP y MaxP ( $P>0,1$ ).

En cuanto a las diferencias entre origen genético, para todas las variables de emisión de metano, menos en g/d, se encontró mayor emisión en las vacas NZH que en las vacas NAH bajo la estrategia de máxima pastura. Sin embargo, en emisión de metano expresado por unidad de consumo y por kilo de LCG 4%, existió una tendencia ( $P=0,09$  y  $P=0,08$ ) a ser mayor en las vacas de origen neozelandés que en las norteamericanas en pastura fija, mientras que para las demás variables no hubo diferencias significativas entre las neozelandesas y las norteamericanas en FixP.

Tabla VI. Emisión de metano entérico e intensidad de emisión de metano entérico en vacas Holstein norteamericana (NHA) y neozelandesa (NZH) bajo una estrategia de alimentación con pastura fija (FixP) y con pastura máxima (MaxP).

| Metano Entérico                                          | Tratamientos       |                   |                    | EEM  | P     |
|----------------------------------------------------------|--------------------|-------------------|--------------------|------|-------|
|                                                          | FixP<br>NAH        | MaxP<br>NAH       | MaxP<br>NZH        |      |       |
| gramos/día, g/d                                          | 290                | 266               | 288                | 28,8 | 0,595 |
| CH <sub>4</sub> /kg de MS, g/kg                          | 18,4 <sup>ab</sup> | 15,7 <sup>b</sup> | 22,0 <sup>a</sup>  | 2,13 | 0,007 |
| CH <sub>4</sub> /kg de FDN, g/kg                         | 38,9 <sup>ab</sup> | 33,9 <sup>b</sup> | 45,2 <sup>a</sup>  | 4,51 | 0,025 |
| CH <sub>4</sub> /kg LCG 4% <sup>1</sup> , g/kg           | 10,2 <sup>ab</sup> | 9,2 <sup>b</sup>  | 12,2 <sup>a</sup>  | 1,10 | 0,023 |
| CH <sub>4</sub> /kg sólidos en leche <sup>2</sup> , g/kg | 87,0 <sup>ab</sup> | 79,1 <sup>b</sup> | 103,1 <sup>a</sup> | 9,53 | 0,036 |
| Ym <sup>3</sup> , %                                      | 5,1 <sup>ab</sup>  | 4,7 <sup>b</sup>  | 6,9 <sup>a</sup>   | 0,60 | 0,001 |

Tratamientos: FixP= Pastura Fija (37% pastoreo directo después del ordeño p. m. y hasta el ordeño de a. m. y 63% RPM en pista de alimentación entre el ordeño a. m. y p. m.), MaxP= Pastura Máxima (73% pastoreo directo durante dos turnos y 27% concentrado suministrado durante cada ordeño), NAH=vacas Holstein de origen norteamericano, NZH= vaca Holstein de origen neozelandés

<sup>a,b</sup> indica diferencias significativas ( $P<0.05$ )

<sup>1</sup>LCG 4%: leche correada por arasa al 4%

<sup>2</sup>kg de sólidos en leche: producción de arasa + producción de proteína+ producción de lactosa

<sup>3</sup>Ym: emisión de metano como porcentaje del consumo de energía bruta

### Parámetros del líquido ruminal:

En la Tabla VII se presentan los datos obtenidos de los parámetros del líquido ruminal, donde se puede ver que para todas las variables medidas se encontraron diferencias entre las estrategias de alimentación.

El pH ruminal promedio fue mayor en las vacas sobre la estrategia de pastura máxima que sobre la estrategia con pastura fija ( $P<0,05$ ) y estas tuvieron mayor producción total de AGV que las vacas NAH bajo la estrategia pastura máxima (82,9 vs. 71,4 mM;  $P<0,05$ ).

Tabla VII. pH ruminal, perfil de ácidos grasos volátiles y concentración de  $\text{NH}_3\text{-N}$  en vacas Holstein norteamericana (NAH) y neozelandesa (NZH) bajo una estrategia de alimentación con pastura fija (FixP) y con pastura máxima (MaxP).

| Ítem                             | Tratamientos      |                   |                   | EEM   | P      |
|----------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------|--------|
|                                  | FixP<br>NAH       | MaxP<br>NAH       | MaxP<br>NZH       |       |        |
| pH                               | 6,69 <sup>b</sup> | 6,87 <sup>a</sup> | 6,82 <sup>a</sup> | 0,069 | 0,022  |
| AGV <sup>1</sup> mM Total        | 82,9 <sup>a</sup> | 71,4 <sup>b</sup> | 80,8 <sup>a</sup> | 4,66  | 0,028  |
| AGV mol/100 mol                  |                   |                   |                   |       |        |
| Ácido acético                    | 64,8 <sup>a</sup> | 61,9 <sup>c</sup> | 63,4 <sup>b</sup> | 0,68  | <0,001 |
| Ácido propiónico                 | 18,2 <sup>b</sup> | 21,1 <sup>a</sup> | 21,0 <sup>a</sup> | 0,37  | <0,001 |
| Ácido butírico                   | 17,1 <sup>a</sup> | 16,7 <sup>a</sup> | 15,6 <sup>b</sup> | 0,55  | 0,019  |
| Acético/Propiónico               | 3,6 <sup>a</sup>  | 3,0 <sup>b</sup>  | 3,0 <sup>b</sup>  | 0,08  | <0,001 |
| Acético+Butírico/Propiónico      | 4,5 <sup>a</sup>  | 3,7 <sup>b</sup>  | 3,8 <sup>b</sup>  | 0,09  | <0,001 |
| $\text{NH}_3\text{-N}$ mg/100 mL | 4,6 <sup>c</sup>  | 11,1 <sup>b</sup> | 13,6 <sup>a</sup> | 1,68  | <0,001 |

Tratamientos: FixP= Pastura Fija (37% pastoreo directo después del ordeño p. m. y hasta el ordeño de a. m. y 63% RPM en pista de alimentación entre el ordeño a. m. y p. m.), MaxP= Pastura Máxima (73% pastoreo directo durante dos turnos y 27% concentrado suministrado durante cada ordeño), NAH=vacas Holstein de oríen norteamericano. NZH= vaca Holstein de oríen neozelandés

<sup>a,b,c</sup> indica diferencias significativas ( $P<0,05$ )

<sup>1</sup>AGV; ácidos grasos volátiles

Por otro lado, la concentración de ácido acético fue 64,8 mol/100 mol en las vacas en FixP y 61,9 mol/100 mol en las MaxP ( $P<0,05$ ). En cuanto a la concentración de propiónico en las vacas en MaxP fue de 21,1 y 18,2 mol/100 mol en las FixP ( $P<0,05$ ), no encontrándose diferencias en la concentración de ácido butírico entre esos dos tratamientos ( $P>0,1$ ).

En la relación A/P y A+B/P se encontraron diferencias significativas ( $P<0,05$ ) entre las estrategias de alimentación, siendo mayores estas dos relaciones en las vacas en FixP.

Por último, la concentración ruminal de  $\text{NH}_3\text{-N}$  fue 11,1 mg/100 mL en las vacas NAH en MaxP y 4,6 mg/100 mL en las vacas bajo la estrategia FixP ( $P<0,05$ ).

En cuanto a las vacas dentro de la misma estrategia de alimentación (MaxP) pero diferente origen genético, no se encontraron diferencias ( $P>0,1$ ) en el pH ruminal, pero sí hubo una tendencia ( $P=0,06$ ) a ser mayor en las vacas NZH que en las vacas NAH bajo la estrategia de FixP.

La producción de AGV total fue mayor en las vacas de origen genético neozelandés que en las vacas de origen norteamericano bajo la estrategia MaxP, pero no se encontró diferencias con las vacas de origen norteamericano en FixP ( $P>0,1$ ).

Las vacas NZH tuvieron mayor concentración de ácido acético que las vacas NAH en MaxP, pero menor que las vacas bajo la estrategia de FixP. En cuanto a la concentración de propiónico no se encontraron diferencias ( $P>0,1$ ) entre las vacas bajo la estrategia MaxP. La concentración de ácido butírico fue mayor ( $P<0,05$ ) en las vacas norteamericanas que en las neozelandesas.

Con respecto al relación A/P y A+B/P estas fueron iguales entre los genotipos dentro de la misma estrategia de alimentación, pero fueron menores en las vacas NZH que en las vacas NAH bajo la estrategia FixP ( $P<0,05$ ).

Por último, la concentración ruminal de  $\text{NH}_3\text{-N}$  fue mayor ( $P<0,05$ ) en las vacas NZH que en las NAH dentro de cualquiera de las dos estrategias de alimentación.

## Capítulo 6. Discusión

### Pastura Fija vs Pastura Máxima

En el presente estudio, las vacas en el tratamiento de Pastura Fija (FixP) la pastura represento 27,5% del consumo total de MS, el cual fue levemente inferior al consumo objetivo (37%); en tanto que el consumo de RPM fue de 72,5% del total (objetivo fue 63%). Las vacas en MaxP consumieron casi un 70% de pastura y 30% de concentrado en sala mientras que el consumo objetivo fue de 73% y 27% para pastura y concentrado, respectivamente. Era esperable que las vacas en Pastura Fija tuvieran menor consumo de pastura que las vacas en MaxP ya que por su tratamiento tuvieron menor tiempo asignado al pastoreo. Por lo tanto las vacas en FixP consumieron un 40% menos de pastura que las vacas en MaxP.

Llama la atención que el CMS total de las vacas NAH bajos las dos estrategias de alimentación fue idéntico. De todas formas, vale mencionar que el uso del marcador  $\text{TIO}_2$  pudo subestimar la producción de heces (Glindemann et al., 2009; Velásquez et al., 2018) y por lo tanto el consumo de materia seca de pastura también puede estar subestimado. Velásquez et al. (2018) reportaron que vacas lecheras alimentadas con dieta totalmente mezclada obtuvieron una estimación del consumo 24% menor que el consumo de materia seca real cuando se utilizan los marcadores  $\text{TIO}_2$  y FDNi. Es por esto que los datos de consumo presentes en este trabajo pueden estar por debajo de lo real.

Asimismo, en estos tipos de trabajo se encuentra discordancia en los resultados de CMS total con diferentes sistemas de alimentación. Por un lado, se ha encontrado que vacas que consumen tanto RPM como RTM tienen mayor CMS que vacas en pastoreo suplementadas con concentrado o solo con pastoreo con alta asignación de pastura (Bargo et al., 2002; O'Neill et al., 2012). Por otro lado, Morales-Almaráz et al. (2010) y Pastorini et al. (2019) no encontraron diferencias en el CMS total entre vacas que consumían 100% RTM vs. RPM con 6 o 12 hs de acceso a pastoreo o RPM con 30% de forraje fresco de buena calidad en la dieta.

En las vacas con menos asignación de pastura (FixP), pudo haber ocurrido sustitución de la pastura por la RPM, en acuerdo con otros autores que señalan que cuando se suplementa con forrajes (incluyendo silo de maíz) el consumo de pastura disminuye más que cuando se suplementa con concentrados (Bargo et al., 2003).

El consumo de FDN, además de ser igual en ambas estrategias fue también bajo en función del peso vivo de las vacas. Esto indicaría que no sería este el motivo del consumo más bajo que lo esperado y éste no estaría limitando por el llenado físico del rumen.

Es interesante comentar que los resultados encontrados en el consumo de nutrientes entre las vacas norteamericanas en FixP y MaxP, los cuales no fueron diferentes, coinciden con lo buscado por los tratamientos que tenían el objetivo de proveer la misma cantidad de nutrientes pero de forma diferente. Sin embargo, se encontró que el consumo de proteína fue menor en las vacas en FixP. Esto se puede atribuir al menor contenido de proteína presente en la RPM que consumieron estas vacas en comparación con el contenido de proteína de la pastura. El mayor consumo de almidón de las vacas con pastura fija se puede atribuir al mayor consumo de RPM vs. concentrado en las vacas en MaxP.

La mayor digestibilidad observada para las vacas con menor asignación de pastura (FixP), puede explicarse por un mayor tiempo de rumia de estas vacas, ya que Mendoza (2018), en otro estudio dentro del Proyecto 10-MIL, encontró que vacas bajo la estrategia FixP gastan menos tiempo pastoreando y más tiempo rumiando que vacas en MaxP. Durante la rumia se reduce el tamaño de partícula del alimento y aumenta el área de superficie para la fermentación rápida de la microbiota (Watt et al., 2015). La mayor digestibilidad de FixP no puede explicarse por diferencias en la digestibilidad de la FDN, por lo que hay que atribuirla a otras fracciones de la materia orgánica. Una posibilidad, es una mayor digestibilidad del almidón o de la proteína, pero estas dos no fueron determinadas en el presente trabajo.

Otra posibilidad que puede explicar esta diferencia es una mayor digestibilidad de la RPM que de la pastura. Un incremento en la digestibilidad total puede ser esperado con la inclusión de concentrados en la dieta porque estos usualmente tienen mayor digestibilidad que la pastura (Bargo et al., 2003). Asimismo, un incremento en la digestibilidad ruminal y total del tracto de la materia seca y la materia orgánica ha sido documentada cuando el nivel de almidón en la dieta se incrementa (Reis & Combs, 2000), coincidiendo estos dos trabajos con lo que pudo haber ocurrido con las vacas en FixP.

El mayor nivel de AGV totales encontrados en las vacas con pastura fija (FixP), coincide con el menor pH, con la mayor digestibilidad total y de la materia orgánica y con el mayor consumo de almidón de estas vacas comparadas con las vacas en pastura máxima. Reis & Combs (2000) también encontraron que, en vacas alimentadas con dietas con mayor nivel de almidón, la concentración de AGV totales fue mayor y tuvieron una reducción en el pH ruminal. Sin embargo, se ha visto en la literatura que la falta de consistencia con la cantidad de concentrado suplementado y el pH ruminal de vacas lecheras en pastoreo, sugiere que no hay una relación simple entre la cantidad de concentrado suplementado y el pH ruminal (Bargo et al., 2003).

El mayor nivel de ácido acético encontrado en las vacas en FixP coincide con los puntos de mayor digestibilidad (pero sin diferencias significativas) de la FDN que presentaron porque el ácido acético es un producto final importante de la fermentación de la FDN. La mayor relación A/P y A+B/P obtenida en las vacas en FixP fue debido a la menor concentración de propionato ruminal de estas vacas y el mayor nivel de ácido acético.

La concentración de  $\text{NH}_3$  que fue mayor en las vacas con máxima asignación de pastura, coincide por lo encontrado por Bargo et al. (2002), donde la concentración de amonio fue mayor en las vacas que pastoreaban y eran suplementadas con concentrado que en las vacas alimentadas con RPM sugiriendo que la inclusión de RPM incrementa la captura de nitrógeno.



En este trabajo, el mayor nivel de  $\text{NH}_3$  en MaxP se puede relacionar al mayor consumo de proteína de estas vacas, proveniente de la pastura. A su vez, la menor concentración de  $\text{NH}_3$  ruminal en FixP vs. MaxP se puede deber a la diferencia en el tipo de forraje consumido en cada tratamiento (con un componente alto de silo de maíz en FixP), asociándose al menor consumo de pastura con una considerable reducción de la proteína degradable en rumen (Reis & Combs, 2000). Aun así, la concentración de  $\text{NH}_3$  ruminal promedio encontrado en las vacas en FixP está por debajo del valor mínimo necesario (8 mg/dL) para optimizar el crecimiento de la microbiota del rumen (Reynal & Broderick, 2005).

También se ha visto una reducción en la concentración del amoníaco ruminal cuando se consumen altas cantidades de concentrado, debido probablemente a la capacidad de las bacterias ruminales de utilizar mayores cantidades de amoníaco por un incremento en el suministro de materia orgánica fermentable (Reis & Combs, 2000).

Si bien los resultados de kg de leche por día fueron diferentes entre las estrategias de alimentación, siendo mayor en las vacas con máxima asignación de pastura, la producción de leche corregida por grasa al 4% fue igual entre los tratamientos. Esto coincide con los objetivos productivos planteados por el proyecto, ya que ambas dietas fueron formuladas acorde al mismo objetivo productivo y supliendo la misma cantidad de nutrientes. A su vez, el consumo de materia seca y de la mayoría de los nutrientes fue el mismo, sosteniendo los resultados encontrados en cuanto a producción de leche corregida por grasa.

El mismo nivel productivo de LCG 4%, se logró debido a que las vacas con asignación de pastura fija, a pesar de tener menor producción, lograron mayores niveles de grasa en leche, también encontrado por Bargo et al. (2002). Esto se puede corresponder a los puntos de mayor digestibilidad de la FDN encontrada en FixP vs. MaxP y por ende el mayor nivel de ácido acético en el líquido ruminal, también encontrado en el presente trabajo. De igual manera, vacas que pastorean pasturas de alta calidad y consumen concentrado dos veces al día, a menudo, pero no siempre, producen leche con grasa reducida aun cuando son alimentadas con un correcto nivel de FDN en la dieta (NRC, 2001).

Numerosos trabajos han utilizado la técnica del  $\text{SF}_6$  para medir las emisiones de  $\text{CH}_4$  entérico de vacas lecheras Holstein en pastoreo con diferentes sistemas de alimentación. Entre ellos O'Neill et al. (2012), Jiao et al. (2014), Muñoz et al. (2015) y Dall-Orsoletta et al. (2016) donde las emisiones de metano por kg de materia seca reportados en estos trabajos fueron entre 18,8 y 36,7 g/kg y la emisión de metano por kg de leche corregida se ubicó entre 12,3 y 29,8 g/kg.

Mientras que en Uruguay, como se mencionó anteriormente, los antecedentes reportados en vacas lecheras y utilizando la misma técnica fueron en vacas en pastoreo sin suplementación. Los valores reportados por Dini et al. (2012) y muy similares a los encontrados por Loza, (2017), fueron mayores a los obtenidos en el presente trabajo. La emisión de metano fue de 22,1 g/kg MS y de 19,6 g/kg LCG vs. 18,7 y 10,5 g/kg, respectivamente, obtenidos en el presente trabajo.

El no encontrarse diferencias en las emisiones de metano entre las estrategias de alimentación concuerda con los niveles de consumo total y de cada nutriente, ya que las emisiones de metano son dependientes de la cantidad de alimento consumido y de la composición de la dieta (Johnson & Johnson, 1995).

Sin embargo, debido al superior consumo de almidón que tuvieron las vacas en FixP, se podía esperar que emitieran menos metano, pero no se encontró en estas vacas mayor

proporción de propionato en rumen. La emisión de metano puede ser menor si hay mayor producción de propionato dado que el acetato y butirato promueven la producción de metano mientras que la formación de propionato es considerada como una vía competitiva al uso de los hidrógenos en el rumen (Moss et al., 2000).

A su vez, O'Neill et al. (2012) también obtuvieron iguales emisiones de CH<sub>4</sub>/kg MS con diferentes estrategias de alimentación, pero ellos explican estos resultados por la alta y similar calidad de la dieta, debido a igual digestibilidad de la materia orgánica en los tratamientos; en el presente trabajo se observaron diferencias, siendo que las vacas en FixP tuvieron unos puntos más de digestibilidad de la materia orgánica que las vacas en MaxP. Parece ser que los dos puntos de digestibilidad observados en este trabajo no fueron suficientes para generar cambios en las emisiones.

En la literatura está fuertemente demostrado que el consumo y el perfil de aporte de nutrientes afecta significativamente las emisiones de metano (Moe & Tyrrell, 1979 Johnson & Johnson, 1995). En este trabajo se puede re-afirmar ya que las vacas de ambos tratamientos tuvieron iguales consumos de materia seca y de la mayoría de los nutrientes medidos, así como iguales emisiones de metano. Por lo tanto, la forma en cómo el alimento es suministrado y con cuales alimentos los nutrientes son aportados no modificaron las emisiones de metano de vacas lecheras en el presente trabajo.

### **Vacas Holstein de Origen Norteamericano vs Vacas Holstein de Origen Neozelandés**

Las vacas NZH consumieron 2,7 kg menos de pastura que las vacas NAH y tuvieron un CMS total de 3,4 kg menos que las NAH. Esta diferencia en los consumos entre los genotipos fue similar a la diferencia ya dada en la asignación de los alimentos, que fue menor en las neozelandesas, correspondiente también al menor tamaño que presentan las vacas neozelandesas. Igualmente es importante mencionar que la diferencia de peso en las vacas del presente trabajo fue solamente de 22 kg a favor de las norteamericanas. A su vez, el consumo expresado como porcentaje de peso vivo (datos no presentados) fue de 3% y 2,5% para las NAH y NZH, respectivamente.

Sheahan et al. (2011) encontraron que vacas de origen neozelandés tienen una mayor tasa de sustitución que vacas de origen norteamericano cuando son alimentadas ambas con una alta asignación de pastura más concentrado y por lo tanto las de origen neozelandés presentaron menor consumo total de materia seca. Adicionalmente, es posible, como ya se mencionó que el consumo de pastura haya sido subestimado en todos los animales, por la técnica utilizada.

Si bien el contenido de FDN de la pastura, que pastorearon las vacas NZH, fue 4,4 puntos porcentuales mayor que el contenido de la pastura de las NAH, estos valores de FDN (58,6%) no son niveles tan altos como para limitar el consumo de las vacas.

Kolver et al. (2002) y Thorne et al. (2003) estudiaron el desempeño de las vacas norteamericanas y neozelandesas bajo estrategias 100% ración totalmente mezclada o en sistema pastoril. En los trabajos mencionados, si bien en el sistema pastoril, luego de la lactancia media, las vacas norteamericanas tuvieron mayor consumo que las neozelandesas (1,8 kg más de MS), el consumo expresado como porcentaje del peso vivo entre los genotipos no fue diferente (3,2%).

El menor consumo total encontrado en las vacas de origen neozelandés coincide con el menor consumo de todos los nutrientes, ya que el concentrado consumido en ambos grupos fue el mismo y las pasturas presentaban características nutricionales similares.

Si bien en el presente estudio no se cuenta con los datos de comportamiento ingestivo, trabajos previos han encontrado diferencias en el comportamiento en pastoreo entre los genotipos estudiados. Vacas de origen norteamericano pasan menos tiempo pastoreando y tienen mayor masa de bocado que las vacas de origen neozelandés, lo que explica el mayor consumo de pastura en las primeras (Thorne et al., 2003; Sheahan et al., 2011). Adicionalmente, Prendiville et al. (2010) reportaron que vacas Holstein tuvieron mayor tiempo de rumia y masticaciones en cada rumia que vacas Jersey. Con esto, en el presente trabajo, se puede esperar que parte de las diferencias en consumo y digestibilidad entre los genotipos pueda estar explicado por diferente comportamiento en pastoreo.

A su vez, Beecher et al. (2014) explican la mayor digestibilidad encontrada en las vacas Jersey que en las Holstein, por tener las primeras mayor tiempo de rumia al expresarlo como porcentaje del peso vivo. La mayor digestibilidad encontrada en las Jersey también la atribuyen por tener un tracto gastrointestinal relativamente más grande que las Holstein. En este sentido también tendrían un área de absorción de los nutrientes relativamente mayor, lo que no coincide con el presente trabajo, ya que el genotipo de menor tamaño (NZH) presentó menor digestibilidad total.

Como era de esperar, las vacas de origen norteamericano produjeron más leche con menor concentración de grasa y proteína que las vacas de origen neozelandés (Roche et al., 2006; Sheahan et al., 2011), consistente la mayor producción con el mayor consumo.

A pesar de las diferencias en el consumo, la emisión de  $\text{CH}_4$  en gramos por día no fue diferente entre los genotipos.

Para todas las variables de  $\text{CH}_4$ , las NZH tuvieron mayor emisión que las NAH en la misma estrategia de alimentación. La mayor emisión de  $\text{CH}_4$  por kg de MS ingerida de las NZH se explica por el bajo consumo de éstas, con una similar emisión diaria de  $\text{CH}_4$ .

Robertson & Waghorn (2002), al igual que el presente estudio reportaron que vacas de origen norteamericano emitieron menos metano por unidad de consumo que vacas de origen neozelandés consumiendo la misma dieta, sea de base pastoril o dieta totalmente mezclada. Los autores atribuyen este hecho a posibles diferencias en la microbiota de vacas de orígenes diferentes. Sin embargo, es importante mencionar que en el estudio de Robertson & Waghorn, (2002) las mediciones de  $\text{CH}_4$  se realizaron utilizando la técnica del trazador  $\text{SF}_6$  pero en solamente cinco vacas por tratamiento, lo que hace que la interpretación de los resultados sea más difícil. Wyngaard et al. (2018) alientan el uso de más de 10 animales para tener en cuenta el alto coeficiente de variación entre animales al realizar experimentos utilizando la técnica del  $\text{SF}_6$  en situaciones de pastoreo.

Por otro lado, Thorne et al. (2003) otorgan las diferencias encontradas en el trabajo de Robertson & Waghorn, (2002) a que las vacas de origen norteamericano quizás tengan una mayor tasa de pasaje que las vacas neozelandesas, posiblemente como resultado de una rumia más eficiente. Esto podría ser parte de la explicación de los resultados encontrados en el presente estudio, por lo que hubiera sido interesante haber estudiado la tasa de pasaje de las vacas en cada grupo.

Es sabido que al aumentar el CMS se acelera el paso del alimento por el aparato digestivo, disminuyendo el tiempo disponible para la fermentación ruminal (Cambra-López et al., 2008) y por lo tanto también de la producción de metano. La cantidad de metano formado por unidad de consumo disminuye con el incremento en la tasa de digestión, lo que ya ha sido demostrado con diferentes tipos de dieta y tanto en ovinos como en vacunos (Janssen, 2010). Sin embargo, la concentración total de AGV en el rumen fue menor en las vacas de

origen norteamericano que en las de origen neozelandés, lo que indicaría que las norteamericanas tuvieron menor fermentación o mayor absorción.

Por el contrario, la digestibilidad total fue mayor en las vacas de origen NAH y se asume que a medida que aumenta la digestibilidad disminuye el  $Y_m$ , dado por la relación negativa que existe entre estas dos variables (Cambra-López et al., 2008) al igual que lo encontrado en el presente trabajo. A su vez, Robertson & Waghorn (2002) concluyeron que las vacas norteamericanas produjeron entre un 8 y un 11% menos de  $CH_4$  como porcentaje de la energía bruta consumida, en comparación con la neozelandesas.

En el presente trabajo el perfil de AGV entre las vacas NZH y las NAH, solo se diferenciaron por el mayor nivel de ácido acético en las NZH, pero la relación A/P y A+B/P no tuvieron diferencias, lo cual no es consistente con lo observado en emisión de metano. Olijhoek et al. (2018) estudiaron la emisión de metano entre vacas Holstein y Jersey, encontrando también que el genotipo más chico, las Jersey, emiten más  $CH_4$  que las vacas Holstein. Los autores expresan que las diferencias en la fermentación del rumen pueden ser relacionadas a la estructura de la comunidad microbiana de cada genotipo.

Resulta interesante mencionar que en este trabajo se obtuvieron muestras del líquido ruminal para estudiar la microbiota entre las vacas de diferente origen genético, pero aún no se cuenta con los resultados que podrían estar explicando las diferencias encontradas en la emisión de  $CH_4$ .

## Capítulo 7. Conclusiones

En este estudio, realizado con vacas lecheras en lactancia media y en primavera, se puede concluir que no hay diferencias en las emisiones de metano entérico entre las estrategias de alimentación planteadas, dónde el nivel de inclusión de pastura fue diferente, pero sí se observaron diferencias entre los orígenes genéticos utilizados para este momento dado.

La similitud de emisiones de metano entérico entre las estrategias de alimentación parece estar vinculada a un similar consumo de nutrientes. A su vez, durante el período de mediciones, las vacas con asignación de pastura fija mantuvieron igual producción de leche corregida por grasa al 4% que las vacas con asignación de pastura máxima debido a que tuvieron el mismo consumo de materia seca y de la mayoría de los nutrientes, como era esperable por el diseño de las dietas.

En emisión diaria de metano, no se encontraron diferencias significativas entre los genotipos. Sin embargo, en la emisión de metano por unidad de consumo, por unidad de producción de leche y como porcentaje de la energía bruta consumida, el genotipo de origen neozelandés emitió más metano que las vacas de origen norteamericano bajo la misma estrategia de alimentación. Las mayores emisiones reportadas en las neozelandesas se dieron ya que tuvieron similar emisión diaria pero un menor consumo, producción de leche corregida al 4% y sólidos totales que las vacas norteamericanas con una asignación de pastura máxima.

El presente estudio aporta información sobre las emisiones de CH<sub>4</sub> en el ganado lechero de Uruguay bajo las estrategias de alimentación y los genotipos más utilizados en el país. El promedio de la emisión de metano de vacas lecheras en lactancia media y en primavera fue de  $281 \pm 29,5$  g/d. Para las vacas de origen norteamericano el Ym fue de 4,9% y para las de origen neozelandés 6,9%. Igualmente, es necesario realizar más investigación sobre las emisiones de CH<sub>4</sub> de los diferentes genotipos a lo largo de la lactancia y dónde además se estudie la microbiota ruminal, el comportamiento ingestivo y la tasa de pasaje para explicar con más profundidad los resultados.

## Referencias Bibliográficas

- Adams, R. F., Jones, R. L., & Conway, P. L. (1984). High-performance liquid chromatography of microbial acid metabolites. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 336(1), 125–137.
- Aguerre, M. J., Wattiaux, M. A., Powell, J. M., Broderick, G. A., & Arndt, C. (2011). Effect of forage-to-concentrate ratio in dairy cow diets on emission of methane, carbon dioxide, and ammonia, lactation performance, and manure excretion. *Journal of Dairy Science*, 94(6), 3081–3093.
- Archimède, H., Eugène, M., Marie Magdeleine, C., Boval, M., Martin, C., Morgavi, D. P., Lecomte, P., & Doreau, M. (2011). Comparison of methane production between C3 and C4 grasses and legumes. *Animal Feed Science and Technology*, 166–167, 59–64.
- Bargo, F., Muller, L. D., Kolver, E. S., & Delahoy, J. E. (2003). Invited Review : Production and Digestion of Supplemented Dairy Cows on Pasture. *Journal of Dairy Science*, 86(1), 1–42.
- Bargo, F., Muller, L. D., Varga, G. A., Delahoy, J. E., & Cassidy, T. W. (2002). Performance of High Producing Dairy Cows with Three Different Feeding Systems Combining Pasture and Total Mixed Rations F. *Journal of Dairy Science*, 85(11), 2964–2973.
- Beauchemin, K. A., Kreuzer, M., O'Mara, F., & McAllister, T. A. (2008). Nutritional management for enteric methane abatement: a review. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 48(2), 21.
- Beecher, M., Buckley, F., Waters, S. M., Boland, T. M., Enriquez-Hidalgo, D., Deighton, M. H., O'Donovan, M., & Lewis, E. (2014). Gastrointestinal tract size, total-tract digestibility, and rumen microflora in different dairy cow genotypes. *Journal of Dairy Science*, 97(6), 3906–3917.
- Bell, M. J., Wall, E., Russell, G., Morgan, C., & Simm, G. (2010). Effect of breeding for milk yield, diet and management on enteric methane emissions from dairy cows. *Animal Production Science*, 50(8), 817–826.
- Bender, R. W., Cook, D. E., & Combs, D. K. (2016). Comparison of in situ versus in vitro methods of fiber digestion at 120 and 288 hours to quantify the indigestible neutral detergent fiber fraction of corn silage samples. *Journal of Dairy Science*, 99(7), 5394–5400.
- Boadi, D., Benchaar, C., Chiquette, J., & Massé, D. (2004). Mitigation strategies to reduce enteric methane emissions from dairy cows: Update review. *Canadian Journal of Animal Science*, 84(3), 319–335.
- Cabral, C. H. A., Paulino, M. F., Detmann, E., Valadares Filho, S. D. C., De Barros, L. V., Valente, É. E. L., De Oliveira Bauer, M., & Cabral, C. E. A. (2014). Levels of supplementation for grazing beef heifers. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 27(6), 806–817.
- Cajaville C., Mendoza, A., Santana, A., & Repetto, J. L. (2012). *En tiempos de intensificación productiva... ¿Cuánto avanzamos en el conocimiento de los nuevos sistemas de Alimentación de la Vaca Lechera?* 48 (1), 35–39.
- Cambra-López, M., Garcia Rebollar, P., Estellés, F., & Torres, A. (2008). Estimación de

- las emisiones de los rumiantes en España: El factor de conversión de metano. *Archivos de Zootecnia*, 57, 89–101.
- Cersosimo, L. M., Bainbridge, M. L., Kraft, J., & Wright, A. D. G. (2016). Influence of periparturient and postpartum diets on rumen methanogen communities in three breeds of primiparous dairy cows. *BMC Microbiology*, 16(1), 1–10.
- Chagunda, M. G. G., Römer, D. A. M., & Roberts, D. J. (2009). Effect of genotype and feeding regime on enteric methane, non-milk nitrogen and performance of dairy cows during the winter feeding period. *Livestock Science*, 122(2–3), 323–332.
- Chilibroste, P. (n.d.). *Los Sistemas Lecheros En Escenarios de Precios Volátiles. 2do Foro de Producción Lechera. Sistemas Sostenibles En Distintos Escenarios. CONAPROLE.*
- Christophersen, C. T., Wright, A. D. G., & Vercoe, P. E. (2008). In vitro methane emission and acetate:propionate ratio are decreased when artificial stimulation of the rumen wall is combined with increasing grain diets in sheep. *Journal of Animal Science*, 86(2), 384–389.
- Clark, H., Pinares-Patino, C., & deKlein, C. (2005). Methane and nitrous oxide emissions from grazed grasslands. *Grassland: A Global Resource*, (May), 279–293.
- Dall-Orsoletta, A. C., Almeida, J. G. R., Carvalho, P. C. F., Savian, J. V., & Ribeiro-Filho, H. M. N. (2016). Ryegrass pasture combined with partial total mixed ration reduces enteric methane emissions and maintains the performance of dairy cows during mid to late lactation. *Journal of Dairy Science*, 99(6), 4374–4383.
- Dini, Y., Cajarville, C., Gere, J. I., Fernandez, S., Fraga, M., Pravia, M. I., Navajas, E. A., & Ciganda, V. S. (2019). Association between residual feed intake and enteric methane emissions in Hereford steers. 65–72.
- 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(2), 288–300.
- Fariña, S. R., & Chilibroste, P. (2019). Opportunities and challenges for the growth of milk production from pasture: The case of farm systems in Uruguay. *Agricultural Systems*, 176(May).
- Gere, J. I., & Gratton, R. (2010). Simple, low-cost flow controllers for time averaged atmospheric sampling and other applications. *Latin American Applied Research*, 40(4), 377–381.
- Glindemann, T., Tas, B. M., 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(3–4), 186–197.
- Hammond, K. J., Jones, A. K., Humphries, D. J., Crompton, L. A., & Reynolds, C. K. (2016). Effects of diet forage source and neutral detergent fiber content on milk production of dairy cattle and methane emissions determined using GreenFeed and respiration chamber techniques. *Journal of Dairy Science*, 99(10), 7904–7917.
- Huhtanen, P., Kaustell, K., & Jaakkola, S. (1994). The use of internal markers to predict total digestibility and duodenal flow of nutrients in cattle given six different diets. *Animal Feed Science and Technology*, 48(3–4), 211–227.
- Janssen, P. H. (2010). Influence of hydrogen on rumen methane formation and fermentation balances through microbial growth kinetics and fermentation thermodynamics. *Animal Feed Science and Technology*, 160(1–2), 1–22.

- Jiao, H. P., Dale, A. J., Carson, A. F., Murray, S., Gordon, A. W., & Ferris, C. P. (2014). Effect of concentrate feed level on methane emissions from grazing dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 97(11), 7043–7053.
- Johnson, Huyler, M., Westberg, H., Lamb, B., & Zlmmmerman, P. (1994). *Measurement of Methane Emissions from Ruminant Livestock Using a SF6 Tracer Technique*. (2), 359–362.
- Johnson, K. a, & Johnson, D. E. (1995). Methane emissions from cattle Methane Emissions from Cattle. *J Anim Sci*, 73(January), 2483–2492.
- Kolver, E. S., Roche, J. R., De Veth, M. J., Thorne, P. L., & Napper, a R. (2002). Total mixed rations versus pasture diets: Evidence for a genotype x diet on the concentration of amino acid-derived volatiles in milk. *New Zealand Society of Animal Production*, 62, 246–251.
- Loza, C. (2017). *CONSUMO , GASTO ENERGÉTICO Y EMISIONES DE DIFERENTES BIOMASAS*. Facultad de Agronomía, UDELAR.
- Machado, F. S., & Chaves, A. V. (2011). Emissões de metano na pecuária: conceitos, métodos de avaliação e estratégias de mitigação. *Embrapa Gado de Leite, 2011. 92 p.* (Embrapa Gado de Leite. Documentos, 147), 1–92.
- Meikle, A., Cavestany, D., Carriquiry, M., Adrien, M. de L., Artegoitia, V., Pereira, I., Ruprecht, G., Pessina, P., Rama, G., Fernández, A., Breijo, M., Laborde, D., Pritsch, O., Ramos, J. M., de Torres, E., Nicolini, P., Mendoza, A., ... Chilibroste, P. (2013). Avances en el conocimiento de la vaca lechera durante el período de transición en Uruguay: un enfoque multidisciplinario. *Agrociencia Uruguay*, 17(1), 141–152.
- Mendoza, A. (2018). *Holstein genetic strain and feeding system affects feeding behaviour strategy of dairy cows during late lactation*. (September).
- Ministerio de medio ambiente. (2017). *INGEI*.
- Moe, P. W., & Tyrrell, H. F. (1979). Methane Production in Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*, 62(10), 1583–1586.
- Morales-Almaráz, E., Soldado, A., González, A., Martínez-Fernández, A., Domínguez-Vara, I., De La Roza-Delgado, B., & 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.
- Morgavi, D. P., Forano, E., Martin, C., & Newbold, C. J. (2010). Microbial ecosystem and methanogenesis in ruminants. *Animal*, 4(7), 1024–1036.
- Moss, A. R., Jouany, J.-P., & Newbold, J. (2000). Methane production by ruminants: its contribution to global warming. *Annales de Zootechnie*, 49(3), 231–253.
- Muñoz, C., Yan, T., Wills, D. A., Murray, S., & Gordon, A. W. (2012). Comparison of the sulfur hexafluoride tracer and respiration chamber techniques for estimating methane emissions and correction for rectum methane output from dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 95(6), 3139–3148.
- Muñoz, Camila, Hube, S., Morales, J. M., Yan, T., & Ungerfeld, E. M. (2015). Effects of concentrate supplementation on enteric methane emissions and milk production of grazing dairy cows. *Livestock Science*, 175, 37–46.
- MVOTMA. (2019). *Tercer informe bienal de actualización*.



- Myers, W. D., Ludden, P. A., Nayigihugu, V., & Hess, B. W. (2003). *Technical Note : A procedure for the preparation and quantitative analysis of samples for titanium dioxide* 1. 2–6.
- Negussie, E., Haas, Y. De, Dehareng, F., Dewhurst, R. J., Dijkstra, J., Gengler, N., & Morgavi, D. P. (2017). Invited review : Large-scale indirect measurements for enteric methane emissions in dairy cattle : A review of proxies and their potential for use in management and breeding decisions. *Journal of Dairy Science*, 100(4), 2433–2453.
- O'Neill, B. F., Deighton, M. H., O'Loughlin, B. M., Galvin, N., O'Donovan, M., & 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 lactation1. *Journal of Dairy Science*, 95(11), 6582–6590.
- O'Neill, B. F., Deighton, M. H., O'Loughlin, B. M., Mulligan, F. J., Boland, T. M., O'Donovan, M., & Lewis, E. (2011). 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.
- Olijhoek, D. W., Løvendahl, P., Lassen, J., Hellwing, A. L. F., Höglund, J. K., Weisbjerg, M. R., Noel, S. J., McLean, F., Højberg, O., & Lund, P. (2018). Methane production, rumen fermentation, and diet digestibility of Holstein and Jersey dairy cows being divergent in residual feed intake and fed at 2 forage-to-concentrate ratios. *Journal of Dairy Science*, 101(11), 9926–9940.
- Pastorini, M., Pomiés, N., Repetto, J. L., Mendoza, A., & 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.
- Pickering, N. K., Oddy, V. H., Basarab, J., Cammack, K., Hayes, B., Hegarty, R. S., Lassen, J., McEwan, J. C., Miller, S., Pinares-Patino, C. S., & De Haas, Y. (2015). Animal board invited review: Genetic possibilities to reduce enteric methane emissions from ruminants. *Animal*, 9(9), 1431–1440.
- Pinares-Patiño, C. S., Machmüller, A., Molano, G., Smith, A., Vlaming, J. B., & Clark, H. (2008). The SF6 tracer technique for measurements of methane emission from cattle - Effect of tracer permeation rate. *Canadian Journal of Animal Science*, 88(2), 309–320.
- Prendiville, R., Lewis, E., Pierce, K. M., & Buckley, F. (2010). Comparative grazing behavior of lactating Holstein-Friesian, Jersey, and Jersey × Holstein-Friesian dairy cows and its association with intake capacity and production efficiency. *Journal of Dairy Science*, 93(2), 764–774.
- Reis, R. B., & Combs, D. K. (2000). Effects of Increasing Levels of Grain Supplementation on Rumen Environment and Lactation Performance of Dairy Cows Grazing Grass-Legume Pasture. *Journal of Dairy Science*, 83(12), 2888–2898.
- Reynal, S. M., & Broderick, G. A. (2005). Effect of dietary level of rumen-degraded protein on production and nitrogen metabolism in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 88(11), 4045–4064.
- Robertson, L. J., & Waghorn, G. C. (2002). Dairy industry perspectives on methane emissions and production from cattle fed pasture or total mixed rations in New Zealand. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production*, 62, 213–218.

- Roche, J. R., Berry, D. P., & Kolver, E. S. (2006). Holstein-Friesian strain and feed effects on milk production, body weight, and body condition score profiles in grazing dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 89(9), 3532–3543.
- Ross, S. A., Chagunda, M. G. G., Topp, C. F. E., & Ennos, R. (2014). Effect of cattle genotype and feeding regime on greenhouse gas emissions intensity in high producing dairy cows. *Livestock Science*, 170, 158–171.
- Sheahan, A. J., Kolver, E. S., & Roche, J. R. (2011). Genetic strain and diet effects on grazing behavior, pasture intake, and milk production. *Journal of Dairy Science*, 94(7), 3583–3591.
- Steiner, S., Neidl, A., Linhart, N., Tichy, A., Gasteiner, J., Gallob, K., Baumgartner, W., & Wittek, T. (2015). Paper : Randomised prospective study compares efficacy of five different stomach tubes for rumen fluid sampling in dairy cows. *Veterinary Record*, 176(2), 50.
- Tapio, I., Snelling, T. J., Strozzi, F., & Wallace, R. J. (2017). The ruminal microbiome associated with methane emissions from ruminant livestock. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 8(1), 1–12.
- THORNE, P. L., J. G. JAGO, E. S., KOLVER, & ROCHE, J. R. (2003). Diet and genotype affect feeding behaviour of Holstein-Friesian dairy cows during late lactation P. *NZ Soc Anim Prod Proc*, 63, 124–127.
- Timpka, T., Eriksson, H., Gursky, E. A., Strömgren, M., Holm, E., Ekberg, J., Eriksson, O., Grimvall, A., Valter, L., & Nyce, J. M. (2011). Nutrient Requirements of Dairy Cattle. In *PLoS ONE* (Vol. 6).
- Titgemeyer, E. C., Armendariz, C. K., Bindel, D. J., Greenwood, R. H., & Löest, C. A. (2001). Evaluation of titanium dioxide as a digestibility marker for cattle. *Journal of Animal Science*, 79(4), 1059–1063.
- van Gastelen, S., Antunes-Fernandes, E. C., Hettinga, K. A., Klop, G., Alferink, S. J. J., Hendriks, W. H., & Dijkstra, J. (2015). Enteric methane production, rumen volatile fatty acid concentrations, and milk fatty acid composition in lactating Holstein-Friesian cows fed grass silage- or corn silage-based diets. *Journal of Dairy Science*, 98(3), 1915–1927.
- Velásquez, A. V., da Silva, G. G., Sousa, D. O., Oliveira, C. A., Martins, C. M. M. R., dos Santos, P. P. M., Balieiro, J. C. C., Rennó, F. P., & Fukushima, R. S. (2018). Evaluating internal and external markers versus fecal sampling procedure interactions when estimating intake in dairy cows consuming a corn silage-based diet. *Journal of Dairy Science*, 101(7), 5890–5901.
- Waller, A., Martínez, R., & Fariña, S. (2017). *Producción y Utilización de Pasturas 40° Congreso Argentino de Producción Animal* (Vol. 37).
- Watt, L. J., Clark, C. E. F., Krebs, G. L., Petzel, C. E., Nielsen, S., & Utsumi, S. A. (2015). Differential rumination, intake, and enteric methane production of dairy cows in a pasture-based automatic milking system. *Journal of Dairy Science*, 98(10), 7248–7263.
- Weatherburn. (1967). Phenol-Hypochlorite Reaction for Determination of Ammonia. *Analytical Chemistry*, 39(8), 971-.
- Wood, P. D. P. (1967). Algebraic model of the lactation curve in cattle. *Nature*, 216(5111), 164–165.

- Wyngaard, J. D. V. Van, Meeske, R., & Erasmus, L. J. (2018). Effect of concentrate feeding level on methane emissions, production performance and rumen fermentation of Jersey cows grazing ryegrass pasture during spring. *Animal Feed Science and Technology*, 241(January), 121–132.
- Yan, T., Mayne, C. S., Gordon, F. G., Porter, M. G., Agnew, R. E., Patterson, D. C., Ferris, C. P., & Kilpatrick, D. J. (2010). Mitigation of enteric methane emissions through improving efficiency of energy utilization and productivity in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 93(6), 2630–2638.