

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN LUIS

Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia



Universidad Nacional
de San Luis

**CONTRIBUCIÓN AL CONOCIMIENTO EN
LA DINÁMICA DE LOS GASES DE
FERMENTACIÓN RUMINAL**

Trabajo de Tesis Doctoral

Doctorando:

Ing. Agr. María Laura Guzmán

Titulación:

Doctor en Biología

Director Académico:

Dr. Ricardo Luis Sager

San Luis-2015

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN LUIS

Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia

Doctor en Biología



**Universidad Nacional
de San Luis**

Trabajo de Tesis Doctoral

**CONTRIBUCIÓN AL CONOCIMIENTO EN LA
DINÁMICA DE LOS GASES DE FERMENTACIÓN
RUMINAL**

Autor

Ing. Agr. María Laura Guzmán

Director

Dr. Ricardo Luis Sager

San Luis-2015

DEDICATORIA

A mis padres, pilares fundamentales en mi vida,
sin ellos, jamás hubiese podido conseguir lo que hasta ahora
Los amo con mi vida.

A mis hermanas por su apoyo y tesón en momentos de decline y cansancio,
por estar siempre y darme la fortaleza necesaria para seguir adelante,

A todos los que me han enseñado a aprender, por su paciencia,
por confiar y creer en mí,

desde lo más profundo de mi corazón,
con mucho amor y cariño
les dedico todo mi esfuerzo y trabajo puesto para la realización de esta tesis.
que sin ellos, no hubiese podido ser.

AGRADECIMIENTO

Debo agradecer en estas líneas la ayuda que muchas personas y colegas me han prestado durante el proceso de investigación y redacción de este trabajo. En primer lugar, quisiera agradecer al director de esta tesis Dr. Ricardo Sager, el haberme animado a realizar estudios de doctorado y haberme orientado en todos los momentos que necesité sus consejos. Sin su ayuda y su interés, esta tesis difícilmente habría llegado a concluirse. Así mismo, deseo expresar mi reconocimiento a Adriana Bengolea, Ángel Gurmendez, Federico Frasinelli, Karina Frigerio, Walter Page y Carlos Frasinelli, por las facilidades y ayuda que me dieron dentro del proceso de investigación y verificación de experimentos en las instalaciones de la EEA San Luis, consiguiendo en esta armonía grupal finalizarlos. También corresponde agradecer a INTA y UNSL, por la oportunidad de formación, no sólo como personal investigador, que he podido disfrutar en este periodo, sino, y principalmente, formándome como personas de bien. Así también a todo el personal de la EEA San Luis y FICA, ya que dentro de los ámbitos que

a cada uno le competen me han colaborado sin ponerme ningún impedimento, brindado siempre una sonrisa

Por último, a mi familia, por haberme dado su fuerza y apoyo incondicional que me han ayudado y llevado hasta donde estoy ahora.

Gracias Dios, gracias papis, gracias hermanas, gracias sobrinas, gracias Ricardo, y muchas gracias a todos los que cooperaron de manera desinteresada para su finalización!!

Índice

SECCIÓN	Pág.
DEDICATORIA	III
AGRADECIMIENTOS	IV
ÍNDICE	V
LISTA DE TABLAS	VIII
LISTA DE FIGURAS	XI
LISTA DE ECUACIONES	XIV
GLOSARIO	XVI
JUSTIFICACIÓN	XIX
OBJETIVOS	XXI
HIPÓTESIS	XXI
CAPÍTULO 1: Introducción al Conocimiento de la Producción y Efecto de los Gases de Fermentación Enterica	
1.1 Revisión	1
CAPÍTULO 2: Estimación de la Producción Empírica de Metano.	
2.1 Introducción	9
2.2 Materiales y Métodos	14
2.2.1 Comparación de niveles metodológicos	14
2.2.1.1 Nivel 1 (N1)	14
2.2.1.2 Nivel 2 (N2)	15
2.2.1.3 Nivel 3 (N3)	16
2.2.2 Inventario San Luis de gases de fermentación entérica	16
2.2.2.1 Parámetros bovinos según sistema productivo de la provincia de San Luis	17
2.2.2.2 Energías constituyentes de la energía bruta (EB)	17
2.2.2.3 Factores de emisión (EF)	18
2.2.2.4 Emisión de CH ₄ enterico.	18
2.2.3 Análisis estadístico	18
2.3 Resultados y discusión	19
2.4 Conclusiones e implicancias	25
CAPÍTULO 3: Metodología de medición <i>in vivo</i> de parámetros ruminales	
3.1 Introducción	26
3.1.2 Métodos de medición de CH ₄	26
3.1.2.1 Determinación de CH ₄ <i>in vivo</i> en Argentina	28
3.2 Materiales y Métodos	33

3.2.1 Principio del Funcionamiento	33
3.2.2 Preparación Animales	33
3.2.3 Características de Equipos	34
3.2.4 Puesta a Punto de Metodología	36
3.2.5 Análisis estadístico	36
3.3 Resultados y discusión	37
3.4 Conclusión	41
CAPÍTULO 4: Desarrollo de Método <i>in vitro</i> para medir Gases de Fermentación Ruminal.	
4.1 Introducción	43
4.1.2 Sistema de la producción de gas ankom RF	44
4.2 Materiales y Métodos	46
4.2.1 Obtención de inóculo	46
4.2.2 Tratamientos en laboratorio	46
4.2.3 Presion de gas	48
4.2.4 Análisis estadístico...	49
4.3 Resultados y discusión	49
4.4 Conclusión	54
CAPÍTULO 5: Relación entre Dieta y Producción de Gases Entericos	
5.1 Introducción	55
5.1.2 Dieta y Metano en bovinos	56
5.1.2.1 Almidón	58
5.1.2.1 Gluten Feed de Maíz (GF)	60
5.2 Materiales y Métodos	61
5.2.1 Medición de Gases Ruminales	62
5.2.2 Respuesta Animal	63
5.2.3 Análisis Estadístico	63
5.3 Resultados y Discusión	64
5.4 Conclusión	77
CAPÍTULO 6: Relación de la Producción de Gases Entéricos con el Bienestar y Salud Animal	
6.1 Introducción	79
6.1.1 Bienestar Animal.	80
6.1.2.1. Poliencefalomalcia	81
6.1.2.2 Intoxicación por Compuestos Nitrogenados	84
6.1.2.3 Neumonía Intersticial Atípica (NIA)	86
6.1.2.4 Acidosis.	88
6.2 Materiales y Métodos	91
6.2.1 Analisis Estadistico	95
6.3 Resultados	96
6.4 Discusión	100

6.5	Conclusión	104
CAPÍTULO 7: Efecto Ambiental de la Emisión de Gases de Origen Ganadero		
7.1	Introducción	105
7.2	Materiales y Métodos	108
7.2.1	Equipos	109
7.2.2	Metodología de Medición	110
7.2.2.1	<i>in situ</i>	110
7.2.2.2	<i>in vitro</i>	111
7.2.3	Análisis Estadístico	111
7.3	Resultados	111
7.4	Discusión	115
7.5	Conclusión	117
CAPÍTULO 8: Opciones de Mitigación de GEI asociada al Sector Ganadero		
8.1	Introducción	118
8.1.2	Modificaciones en la Dieta.	119
8.1.3	Modificaciones en el Bovino	121
8.1.4	Análisis del Sistema Productivo	123
8.1.5	Contaminación en Sistemas Intensivos. Olor	126
8.2	Materiales y Métodos	127
8.2.1	Análisis Estadístico	128
8.3	Resultados y Discusion	128
8.4	Conclusión	130
CAPÍTULO 9: Integración y Conclusiones Generales.		131
BIBLIOGRAFÍA		XXII
ANEXO		L

LISTA DE TABLAS

Tabla	Pág.
I Emisiones de gases de efecto invernadero de argentina en Gg CO ₂ eq. discriminada por gas y categoría de fuente	13
II Parámetros productivos y químicos de Sistema Ganadero en San Luis	15
III Ecuaciones utilizadas para calcular Energía Bruta (EB)	16
IV Parámetros del animal y alimentos característicos de San Luis	17
V Coeficientes utilizados para cálculos de Energías Netas	18
V Emisión promedio de CH ₄ (MJ*d ⁻¹) entérico en función a etapa productiva y metodología de cálculo	19
VII Precursores de Emisión CH ₄ entérico: FE para N1, N2 y AGV para N3	21
VIII Evolución de las emisiones de metano de origen entérico para Argentina y San Luis de acuerdo a los lineamientos del “Panel Intergubernamental sobre el Cambio Climático”, Nivel I, enGgCO ₂ eqaño ⁻¹	23
IX Emisiones de CH ₄ procedentes de la fermentación entérica expresada como el gas original y sus equivalencias y estratificada por departamentos. San Luis, 2009	24
X Estadística descriptiva de parámetros poblacional en rumen	38
XI Estadística descriptiva de gases ruminales con raciones de alta, media y baja calidades	41
XII Composición solución buffer Kansas State	47
XIII Parámetros de calidad nutricional de alfalfa y pasto llorón.	50
XIV Descripción matemática y parámetros estadísticos de los modelos evaluados	51
XV Coeficientes del modelo Monomolecular y estadísticos asociados	51

XVI Proporción de ingredientes (%MS), en las raciones experimentales con GF	61
XVII Características químicas de las raciones evaluadas.	64
XVIII Efecto sobre la Correlación de Pearson entre, concentración de GF y calidad.	65
XIX Concentración media de los gases ruminales en dietas con GF.	66
XX Test de Nemenyi en los bloques de NH ₃ , H ₂ S y CH ₄	67
XXI Composición química de Heno de Alfalfa (muestra) en base a MS	92
XXII Estadística descriptiva de la DVIVMS de alfalfa	96
XXIII Prueba de la normalidad	96
XXIV Análisis No Paramétrico: Prueba de Mann-Whitney	97
XXV Medias de pH in vitro en un período de 22 h de fermentación.	97
XXVI Medias diurnas del pH ruminal de animales alimentados con ración altamente fermentescible con diferentes aditivos.	98
XXVII Análisis comparativo entre la curva de pH del HCO ₃ Na y otros aditivos.	100
XXVIII Determinación <i>in situ</i> de la concentración media de CH ₄ , O ₂ , CO y CO ₂ del suelo de un sistema intensivo de engorde bovino	112
XXIX Media de CO ₂ % en corrales	113
XXX Media de CH ₄ % y CO ₂ % en Trampa de Sólidos	113
XXXI Media de CH ₄ % y CO ₂ % en Lagunas anaeróbicas	113
XXXII Descriptivos de Laguna facultativa	113

XXXIII Determinación in vitro de la concentración media de metano (CH ₄), monóxido de carbono (CO) y dióxido de carbono (CO ₂) del suelo del corral de engorde.	114
XXXIV Resumen Descriptivos y T – Ensayo enzimático	129

LISTA DE FIGURAS

Figura	Pág.
1 Crecimiento y proyección de la población mundial (miles de millones)	XIX
2 Mecanismo de síntesis de metano (CH ₄)	3
3 Balance del Hidrógeno (H ₂) del modelo de Bannink y otros (2005)	12
4 Promedios de los factores con respecto a la media global.	20
5 Medición in vivo de CH ₄ entérico en INTA Castelar	29
6 Máscara facial para colecta de gases	29
7 Componentes del módulo de Telemetría	30
8 Medición on line de CH ₄ entérico por Telemetría	30
9 Ubicación del tubo endotraqueal	31
10 Componentes del sistema de medición	32
11 Sistema de colección continua de gases con botellón	33
12 Cirugía en animales de EEA San Luis	34
13 Equipos Portátil de cuantificación de gases RX-415 y Eagle	36
14 Diagramas de cajas para CH ₄ , O ₂ , CO, CO ₂ , NH ₃ y H ₂ S ruminal	38
15 Componentes del Sistema Ankom RF	45

16	Extracción de inóculo	47
17	Acondicionamiento de Inóculo en laboratorio	48
18	Gráfica de la medición del volumen e gas acumulado de alfalfa y pasto llorón	52
19	Relación entre ganancia de peso y producción de metano en rumiantes	57
20	Relación consumo de materia seca y producción de metano	57
21	Biplot relacionando la inclusión de GF en la ración y los parámetros nutritivos	66
22	Dispersión de resultados entre los tratamientos y bloques	67
23	Diferencia en la generación de CH ₄ con diferentes concentraciones de GF	68
24	Diferencia de NH ₃ ruminal entre distintas inclusiones de GF	70
25	Diferencia de H ₂ S ruminal entre distintas inclusiones de GF	72
26	Concentración de CH ₄ ruminal en dietas con GF	73
27	Concentración de NH ₃ ruminal en dietas con GF	74
28	Concentración de O ₂ ruminal en dietas con GF	74
29	pH ruminal en dietas con GF	75
30	Ganancia de peso vivo en dietas con GF	76
31	Consumo MS y ganancia diaria por unidad de tamaño metabólico	77
32	Metabolismo de las Bacterias Ruminales de Azufre en rumen	83

33	Incubador Daisy II (Tecnología Ankom)	94
34	Obtención y lectura de pH del líquido ruminal	94
35	Evaluación de pH <i>in vitro</i> en raciones con distintos aditivos	98
36	pH y horas de medición en relación a la media general del ensayo	99
37	Diferencias del pH ruminal entre las distintas horas de día	99
38	Equipo Reike Keiki RH -515 y accesorio de adaptación para medición en superficies líquidas.	109
39	Imagen satelital del establecimiento de engorde intensivo comercial, con identificación de las 5 áreas de medición de calidad del aire	110
40	Dinámica de gases <i>in vitro</i> con distintas concentraciones de O ₂	114

LISTA DE ECUACIONES

Ecuación	Pág.
1 Producción de CH ₄ estimada a partir de balance de H ₂	12
2 Factor de conversión de CH ₄	15
3 FE: factor de emisión en CH ₄ , kg/año	15
4 Emisión de CH ₄	16
5 Energía Bruta	17
6 Ecuación de Horwitz	37
7 Ley de gas ideal	48
8 Ley de Avogadro	48
9 Modelo estadístico	49
10 Diseño en bloques completos	63
11 Estimación de CH ₄ a partir de digestibilidad	68
12 Estimación de NH ₃ a partir de PB	70
13 Estimación de H ₂ S a partir de concentración de gluten feed	72
14 Modelo factorial	95
15 Determinación de la DIVMS a partir de pool de licores fecales	101
16 Determinación de la DIVMS a partir de licor fecal (dieta digitaria)	102

17	Determinacion de la DIVMS a partir de licor fecal (dieta alfalfa)	102
18	Estimación de CH ₄ a partir de la grasa de la dieta.	120

GLOSARIO DE TÉRMINOS

GASES

CH ₄	Metano
CFC	Clorofluorcarbonados
CO ₂	Dióxido de carbono
H ₂ S	Sulfuro de Hidrógeno
H ₂	Hidrógeno
N ₂ O	Óxido nitroso
NH ₃	Amoniaco
O ₂	Oxígeno
SF ₆	Hexafluoruro de azufre

SIGLAS DE ORGANISMOS

AOAC	Asociación Oficial de Químicos Agrícolas
CICUAL	Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio.
CICVyA	Centro de Investigación en Ciencias Veterinarias y Agronómicas
EEA	Estación Experimental Agropecuaria
ENA	Encuesta Nacional Agropecuaria
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación OMM Organización Meteorológica Mundial
FICA	Facultad de Ingeniería de Ciencias Agropecuarias
IPCC	Panel Intergubernamental sobre Cambio Climático
INDEC	Instituto Nacional de Estadística y Censos
INTA	Instituto Nacional Tecnología de Alimentos
PNUMA	Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente

SENASA	Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria
USEPA	United States Environment Protection Agency
UNFCCC/CMCC	Convención Marco de las Naciones Unidas sobre el Cambio Climático
UNSL	Universidad Nacional de San Luis

TÉRMINOS GENERALES

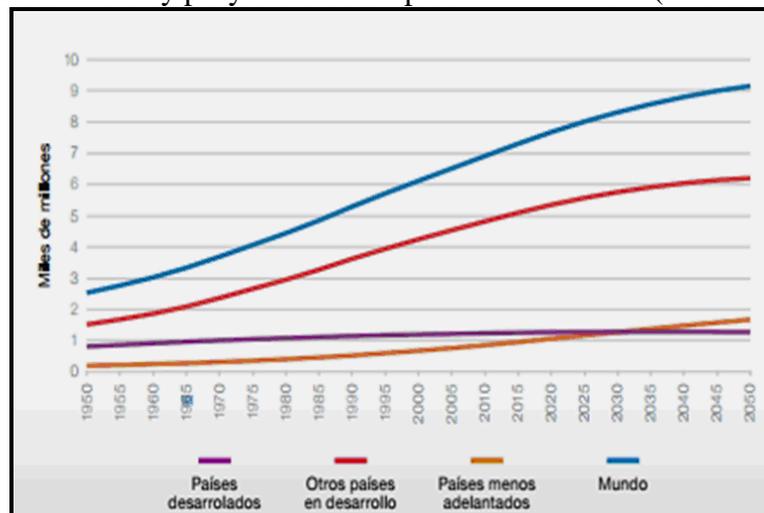
3-Mi	3 metil-indol
Aa	Aminoácidos
ACV:	Análisis Ciclo de Vida
AGV	Ácidos grasos volátiles
AIA	Ácido indolácetico
BAS	Bacterias Asimiladoras de Sulfatos
BDS	Bacterias Desasimiladoras de azufre
BRS	Bacterias Reductoras de Sulfatos
COV	Compuestos Orgánicos Volátiles
CVH	Coficiente de variación de Howertz
Dig. (%)	Digestibilidad en porcentaje
EB	Energía bruta
FND	Fibra Detergente Neutra
GEI	Gases de Efecto Invernadero
GF	Gluten Feed
Gg	Gigagramo
GP	Ganancia de Peso
Gt de CO ₂ eq	Gigatonelada de dióxido Carbono equivalente
HC	Hidratos de Carbono
HCNE	Hidratos de Carbono No Estructurales
Hy	Hidrógeno neto
IR	Radiación Infraroja

LCA	Análisis Ciclo de la Vida
MJ*d-1	Mega joule por día
MO	Microorganismos
MS	Materia seca
NIA	Neumonía artificial atípica
PA (Kg)	Peso Adulto (Kilos)
PB	Proteína bruta
PM	Peso Metabólico
ppb	Partes por billón
ppbv	Partes por billón volumen
ppt	Partes por trillón
PRG	Poder de recalentamiento global
PV (Kg)	Peso vivo (Kilos)
RF	Radiofrecuencia
RFI (CRA)	Consumo Residual del Alimento
Tg	Teragramos
UFL	Unidad forrajera leche
WDGS	Granos de destilería húmedos con solubles

JUSTIFICACIÓN

El clima de la tierra enfrenta rápidos cambios que afectan tanto la composición de la atmósfera como el balance de la radiación solar, jugando un rol principal las actividades ganaderas. Basados en el análisis de ciclo de vida (LCA) realizado por Steinfeld y colaboradores (2006) se ha estimado que el sector emite 7.1 Gt de CO₂eq (Giga toneladas de dióxido de carbono equivalente), lo que representa el 18% de las emisiones totales antropogénicas. Este resultado está representado por 2.5 Gt CO₂eq emitido por el suelo y cambio de uso del suelo; 0.4 Gt CO₂eq en la producción del alimento; 1.9 Gt CO₂eq a partir del metabolismo animal; 2.2 Gt CO₂eq del manejo de estiércol y 0.03 Gt CO₂eq en transporte. Los reportes de IPCC del 2007 indican que este sector emite entre 5.1 a 6.1 Gt de CO₂eq*año⁻¹. Por otro lado la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), difunde un informe aseverando que el sector ganadero genera más gases de efecto invernadero, el 18%, medidos en su equivalente en dióxido de carbono (CO₂), que el sector del transporte (FAO, 2006). El comunicado destaca que la ganadería es, además, una de las principales causas de la degradación del suelo y de los recursos hídricos. El estudio concluye que la producción mundial de carne se duplicará de los 229 millones de toneladas, en 1999-2001, a 465 millones de toneladas, en 2050, y la de leche aumentará en ese período de 580 a 1.043 millones de toneladas. La principal causa será el crecimiento poblacional, de 6 mil millones de personas actuales, a más de 8 mil millones en 2030 (Fig. 1).

FIGURA 1: Crecimiento y proyección de la población mundial (miles de millones)



D. van

Los modelos de consumo de alimentos se parecen cada vez más en todo el mundo y se orientan hacia alimentos de mejor calidad y más caros como lo son las carnes y productos lácteos (La agricultura en el mundo 2015/2030 -FAO 2002).

En Argentina el consumo de carne total, sumando la vacuna, la aviar, la porcina, y también el pescado, fue para el 2014, de acuerdo a cifras oficiales de gobierno argentino, de 125,6 kilos anuales por habitante, correspondiendo 57.7 kg de bovina, 45 kg aviar y 12 kg porcina. La importancia del sector ganadero radica en la capacidad de transformar sustratos en nutrientes esenciales para población humana, sin embargo, esta producción conlleva una significativa contribución a la emisión de gases de efecto invernadero (GEI). Las mayores contribuciones a la huella de carbono de la carne corresponden a la producción y procesamiento del alimento y a la fermentación entérica, y menor medida al almacenamiento y procesado del estiércol. Dentro del primero se contabilizan las tierras destinadas a pasturas y cultivos de cosecha gruesa, y la segunda se desarrolla en el rumen. La fermentación es la vía principal por la que se generan compuestos; beneficiosos, neutros o perjudiciales, así como una pequeña porción de gases beneficiosos son eliminados del complejo ruminal principalmente a través de los eructos. El sulfuro de hidrógeno (H_2S) y el 3-metilindol considerados perjudiciales, son tóxicos de por sí y el pulmón es el sitio de absorción. La intervención en el manejo de los sistemas productivos modifica los equilibrios necesarios para maximizar la producción, induciendo trastornos que pueden afectar a los propios animales, pueden repercutir sobre la población humana remota, generando un círculo vicioso que afecta la eficiencia del sistema productivo. Las características de la dieta tienen un gran efecto en la producción de gases ruminales, razón por la que países con pocas limitaciones alimentarias para sus ganados, reportan datos con menores emisiones de gas metano y mayores eficiencias energéticas (Kinsman et al., 1995). La fermentación de nutrientes en el rumen produce aparte de estos gases y residuos mayoritarios, otros en menor proporción y que dependen principalmente de la composición de los alimentos y la adaptación de los microorganismos ruminales al procesado de esos sustratos. Por todo lo dicho, es indispensable alcanzar producciones de alimentos sustentables, para lo cual es necesario conocer y comprender el sistema productivo, buscando alternativas para minimizar impactos indeseables y generar opciones de bajo riesgo ambiental, constituyendo esto una prioridad para el futuro de la humanidad.

OBJETIVO GENERAL

Conocer la composición y dinámica de generación de gases ruminales eructables, en relación a la calidad nutricional de la ingesta, que permita evaluar el impacto productivo, sanitario y ambiental de sistemas productivos bovinos por emisión de metano y otros gases.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Desarrollar un método *in vitro* que permita medir los gases de fermentación ruminal.
- ❖ Determinar las proporciones temporales de metano, sulfuro de hidrógeno y amoníaco en rumen de bovinos.
- ❖ Relacionar la emisión de gases con la calidad nutricional de la dieta (Degradabilidad, Proteína Bruta, Fibras, Energía Metabólica).
- ❖ Evaluar el efecto ambiental local potencial que la emisión de gases de fermentación entérica provoca.
- ❖ Proponer estrategias de mitigación para reducir la producción de gases indeseables en los sistemas de producción intensivos de bovinos.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

El conocimiento de la dinámica de la emisión de gases de fermentación ruminal y su relación con factores nutricionales, nos permite corregir alteraciones metabólicas en el proceso de digestión que redunden en beneficios productivos y ambientales.

Capítulo 1:

INTRODUCCIÓN AL CONOCIMIENTO DE LA PRODUCCIÓN Y EFECTO DE LOS GASES DE FERMENTACIÓN ENTERICA

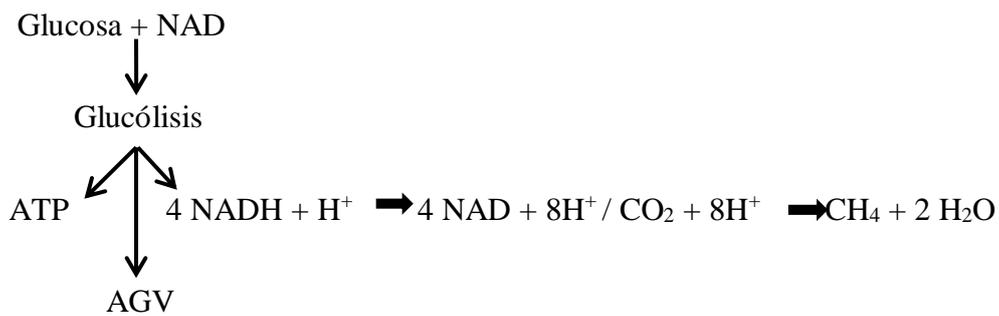
1.1 REVISIÓN

Los rumiantes emiten CH_4 debido a la fermentación microbiana de los hidratos de carbono (HC) que se produce en el aparato digestivo, estos poseen tres pre-estómagos: retículo o redecilla, rumen y omaso o librillo. El cuarto componente es el equivalente al estómago de los monogástricos (Koning y Liebich, 2005) y se denomina abomaso o estómago verdadero. Las tres primeras cavidades se encargan de la degradación de los alimentos por medios mecánicos (rumia) o enzimática (principalmente celulosa, a través de la flora microbiana) y de la síntesis de ácidos grasos de cadena corta (ácidos acético, butírico y propiónico). En el omaso se lleva a cabo la reabsorción de agua del contenido omasal. El metano es expulsado primordialmente a través de eructos y de la respiración y en menor cantidad por flatulencias. El 87% del CH_4 se produce en el rumen y el 13% en el tracto digestivo posterior (McCaughey *et al.*, 1999; Muñoz *et al.*, 2012). Los rumiantes comienzan a generar CH_4 a las cuatro semanas de vida debido a la retención de los alimentos sólidos en el retículo-rumen. La digestión fermentativa depende del normal desarrollo de los microorganismos (MO), el rumiante crea y mantiene las condiciones ideales (aporte de nutrientes, fácil acceso de los MO al alimento, pH, presión osmótica, temperatura, anaerobiosis y eliminación de los productos de desechos) para su crecimiento y multiplicación, convirtiéndose en un gigantesco medio de cultivo líquido (Relling y Mattioli, 2003). Los productos de la degradación del sistema retículo-rumen pueden resumirse en productos útiles, absorbidos por el bovino para su propia nutrición o inútiles que deben ser eliminados como desecho. Dentro de los primeros encontramos el amoníaco (NH_3), ácidos grasos volátiles (AGV), aminoácidos (aa), vitaminas, minerales, etc. Entre de los desechables figuran los gases producidos en el proceso de fermentación CH_4 , CO_2 , H_2S , residuos líquidos y sólidos no degradables que componen las heces. Los HC representan el componente más abundante en la dieta de los rumiantes. El tipo de HC predominante en la dieta condiciona el desarrollo del tipo de flora adecuada para su fermentación, así, una ración rica en almidón es fermentada por

una flora amilolítica que desarrolla mejor a un pH de 5.5 a 6.0 mientras que una ración compuesta por forraje con alto contenido de HC estructurales (celulosa, hemicelulosa y pectinas) será fermentada por una flora celulítica que desarrolla mejor a pH de 6 a 6.9. Para poder adecuar el pH, indicador de salud animal, se ponen en juego 3 factores: saliva, producción y absorción de AGV/NH₃. La saliva actúa como un factor alcalinizante (pH 8.1-8.3), su producción depende fundamentalmente de las horas de rumia y esta, de la mayor cantidad de HC estructurales, pero esa fibra debe tener un tamaño adecuado para estimular la rumiación. Cuanto mayor es la producción de AGV (dietas ricas en concentrados energéticos) más bajo es el pH y mayor es su velocidad de absorción, evitando su acumulación en el rumen. Uno de las vías de absorción de AGV es la difusión simple, mecanismo electro-neutro, que no utiliza transportador, pero requiere que los AGV se encuentren en su forma no disociada, liposolubles. Sin embargo, al pH normal están en su forma disociada (<pK) y por lo tanto no podrían ser absorbidos por difusión. A través de la secreción de hidrogeniones (H⁺), desciende el pH sobre la superficie de las células del epitelio ruminal, permitiendo la difusión de los AGV. El otro mecanismo de absorción de los AGV es más directo y no requiere del bombeo de H⁺, sino de un contra transportador que ingresa el AGV intercambiándolo con bicarbonato (CO₃H⁻) en la superficie apical. En síntesis, el efecto del pH tiene una gran importancia en la producción de metano por parte de los rumiantes debido a que las bacterias metanógenas son sensibles a pH bajos, la disminución en la relación acetato/propionato dependiente del pH es debida posiblemente por una inhibición de la metanogénesis, motivada por la toxicidad de los ácidos de la fermentación que se origina a un pH bajo (van Kessel y Russell, 1995). Los MO del rumen sólo disponen de la vía glucolítica para obtener energía, utilizan el ATP y eliminan los AGV como un producto de desecho, pero para poder degradar una segunda molécula de glucosa y continuar el ciclo se necesita que el cofactor que se ha reducido (NADH⁺) vuelva a su estado oxidado (NAD). El NADH⁺ se regenera transfiriendo un electrón a un aceptor distinto del O₂, debido a que estamos en anaerobiosis. Esta condición, además de la ausencia de luz y presencia de NO₃⁻, S y SO₄²⁻, favorece la proliferación de organismos metagenómicos. Uno de los más importantes aceptores es el carbono, originando la formación de metano (Fig. 2). Aunque el metano no posee rutas metabólicas para degradarlo perdiéndose por eructación (Beauchemin *et al.*, 2006), es importante para reiniciar el ciclo glucolítico. El metano puede representar una pérdida de entre el 2 y 12% de la energía bruta consumida por el rumiante (Kreuzer y Hindrichsen, 2006;

Machmüller *et al.*, 2007), lo que representa entre 16 a 26 g/kg MS consumida, correspondiendo los valores menores a dietas de alto porcentaje de granos (Hristov *et al.*, 2013). El metano se produce en condiciones estrictamente anaeróbicas por procariotas especializados del reino de las *Archaea*. Las relaciones entre los microorganismos son complejas, existiendo interacciones entre ellos de competencia, sinergismos y antagonismo. El ejemplo típico se observa cuando la supresión de protozoos disminuye la metanogénesis debido a la transferencias de H⁺ y formato a través de rutas que incluyen enzimas con enlaces hidrogenosomas (Morgavi *et al.*, 2010). Estos metanógenos están representados por ectosimbiontes que quimiotácticamente alcanzan la superficie del protozario después de que se alimenten porque aumentan la producción de H⁺ (Firkins y Yu, 2006; Ushida, 2010).

FIGURA 2: Mecanismo de síntesis de metano (CH₄)



Los modelos basados en la estequiometría de la fermentación, han sido utilizados para determinar la producción de metano. Estos modelos indican que existe una relación negativa entre la proporción molar de propionato y la excreción de metano por unidad de sustrato fermentado (Moss y Givens, 2002). Sin embargo, existen discrepancias en cuanto a la influencia del acetato y el propionato en el aumento y disminución de la producción de CH₄. Las sustancias reducidas de bacterias ruminales fermentadoras de carbohidratos se desplazan a bacterias metanógenas, lo que provoca un aumento del acetato y generalmente una disminución del propionato. Otros autores apuntan que bajo dichas condiciones predomina el acetato, pero no se considera como un precursor de metano en el rumen (van Kessel y Russell, 1996). Por el contrario, otros consideran que la producción de metano aumenta con la presencia de acetato y butirato, mientras que la formación de propionato actúa de manera competitiva en el uso del H₂ en el rumen (Moss *et al.*, 2000). Las emisiones de metano no se suelen considerar

de manera independiente al separar los tipos de energía, consecuentemente, durante la determinación de la eficiencia alimentaria se ignoran estas emisiones. Muchos valores de energía metabolizable contienen la estimación de expulsión de metano de los carbohidratos digeribles y no tienen en cuenta la relación negativa entre la producción de CH_4 y la formación de propionato. Sin embargo, la baja eficiencia está asociada con una alta proporción acetato/propionato, lo que involucra la producción de metano (van Soest, 1994). Las dietas basadas en forrajes de baja calidad no provocan una reducción considerable en el pH ruminal y están asociadas a una alta producción de metano. En cambio, dietas con elevados contenidos de alimentos concentrados, generalmente reducen la producción de metano. Esta reducción se produce únicamente en el caso de que el consumo sea lo suficientemente alto para originar una reducción en el pH ruminal (van Kessel y Russell, 1996). Dietas basadas en forrajes, pero con bajo pH, provocan la disminución de la metanogénesis, independiente de la formación de propionato (Moss y Givens, 2002). La importancia del CH_4 , se debe que constituye uno de los principales gases de efecto invernadero (GEI). Los GEI presentan la capacidad de absorción de los rayos infrarrojos de onda corta proveniente del reflejo de los rayos solares por la superficie terrestre, provocando un calentamiento en la capa inferior de la atmósfera (tropósfera), como consecuencia, aumento de la temperatura global, afectando la superficie de ocupación del agua, distribución de desiertos, ecosistemas forestales, generación de nuevas plagas, etc. Aunque históricamente el clima ha sufrido ciclos, el efecto invernadero se basa en las concentraciones crecientes de dióxido de carbono, junto con otros gases resultantes de las actividades humanas, que afectan la temperatura superficial de la Tierra, debido a la interacción entre los gases y la radiación que escapa de la Tierra (Convención del Cambio Climático, 1992). La mayor parte de la radiación solar incidente no llega a la superficie de la Tierra, ya que el ozono atmosférico filtra la mayor parte de la radiación ultravioleta, mientras que el vapor de agua y el dióxido de carbono atmosférico absorben buena parte de la radiación infrarroja. Aproximadamente la tercera parte de la luz que llega a la superficie terrestre vuelve a reflejarse hacia el espacio en forma de radiación infrarroja con longitudes de onda más larga, impidiendo el CO_2 la salida de la atmósfera. El dióxido de carbono se comporta, en realidad, como un filtro de un solo sentido, permitiendo que pase la luz visible en una dirección, pero impidiendo que la luz de una longitud de onda mayor se desplace en sentido opuesto (Tovar, 2002). El CH_4 es un potente gas con un poder de calentamiento global (PRG) aproximadamente 21 veces superior al CO_2 , importante en lo que se refiere a potencial

de absorción de radiación (Moss *et al.*, 2000). Este gas, principal residuo gaseoso de la fermentación entérica, se conoce desde de 1940 cuando Migeotte observó que la absorción de las bandas de la región del infrarrojo (IR) del espectro solar se debían a la presencia de metano. A partir de aquí empezaron numerosas investigaciones, actualmente la concentración media de CH₄ es de 1720 ppbv, más del doble de su valor en la época pre-industrial (700 ppbv). Este valor se relaciona con el aumento poblacional, ya que el 70% corresponde a fuentes antropogénicas, y de éstas, dos tercios a la agricultura. En 1988 la Organización Meteorológica Mundial (OMM) y el Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA) crearon el Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático (IPCC). Su función consiste en analizar de forma exhaustiva, objetiva, abierta y transparente, la información científica, técnica y socioeconómica relevante para entender los elementos científicos del riesgo que supone el cambio climático, sus posibles repercusiones y las posibilidades de adaptación y atenuación de mismo. Una de las principales actividades del IPCC es hacer una evaluación periódica de los conocimientos sobre el cambio climático y elaborar informes y documentos técnicos para asesoramiento. La estimación de CH₄ es obligatoria para aquellos países comprometidos con el medioambiente (Firmantes protocolo de Kyoto, 1998), y debe reflejarse en los Inventarios Nacionales de Emisiones a la Atmósfera (Ellis *et al.*, 2010). Para ello, el IPCC proporciona ecuaciones de cálculo de las emisiones que dependen de una serie de factores. Los rumiantes contribuyen, a través de la fermentación ruminal e indirectamente cuando el material fecal se descompone anaeróbicamente en aproximadamente una cuarta parte de todas las emisiones antropogénicas de metano (Lassey, 2007; Smith *et al.*, 2007). A través del análisis de ciclo de vida (LCA) realizado por Steinfeld (2006) se determinó que el sector emite 7.1 Gt de CO₂eq, lo que representa el 18% de las emisiones totales antropogénicas. Las características de la dieta tienen un gran efecto en la producción de gases ruminales, razón por la que países con pocas limitaciones alimentarias para sus ganados, reportan datos con menores emisiones de gas metano y mayores eficiencias energéticas. (Kinsman *et al.*, 1995). La fermentación de nutrientes en el rumen produce aparte de estos gases y residuos mayoritarios, otros en menor proporción y que dependen principalmente de la composición de los alimentos y la adaptación de los microorganismos ruminales al procesado de esos substratos. En el caso del azufre (S) generalmente ingresa al sistema digestivo en forma de sales, sulfatos (SO₄²⁻), son utilizados por MO específicos, bacterias reductoras de sulfatos (BRS) como aceptores

de H^+ , reduciendo los sulfatos a sulfuros, S^{2-} (Loneragan *et al.*, 2001). Cuando son producidos por las bacterias asimiladoras (BAS), lo incorporan a cadenas carbonadas para formar aa azufrados (Metionina), de alto valor nutricional. Otros grupos de bacterias reductoras, las desasimiladoras (BDS) lo eliminan al medio ruminal como H_2S (g). Este gas es tóxico para bovino, debido a que en el mecanismo de eructación para su eliminación, es absorbido en pulmones (Kerr *et al.*, 1989), produciendo una intoxicación denominada Polioencefalomalacia (Sager *et al.*, 1990; Oklahoma Animal Disease Diagnostic Laboratory, 2000). Esta enfermedad es clasificada dentro del grupo de las metabólicas debido a que en la mayoría de los casos reportados es debido a un mal manejo de la dieta. Otro constituyente de la ración que podría afectar la salud animal es el almidón. Cuando las dietas concentradas contienen gran cantidad de este HC soluble, se dispone de excesiva cantidad de L-triptófano en rumen, cuyo exceso es metabolizado por la microflora dando como resultado el ácido indolacético (AIA), el cual es decarboxilado a 3-metilindol (3-MI) por *Lactobacillus sp.* Este metabolito gaseoso (3-MI) es la causa documentada de una enfermedad respiratoria aguda del ganado bovino adulto conocida como Neumonía Intersticial Atípica (NIA). Experimentalmente dosis intraruminales de triptófano causan lesión pulmonar pero no ocurre lo mismo si se administra por vía endovenosa; esto sugiere que el metabolismo a nivel ruminal es un paso imprescindible para la generación del compuesto tóxico. El nivel de 3-MI en plasma, está influenciado por una interacción compleja de factores, dentro de los cuales podemos mencionar la alimentación recibida, composición del alimento, la individualidad en la fisiología animal y posibles disparadores medioambientales como temperatura elevada y días secos. La NIA es una de las causas de muerte súbita en los engordes. Si bien las tasas de mortalidad reportadas son bajas, pueden llegar a ser la segunda causa de muerte dentro de lo que es el complejo respiratorio bovino. Intervenciones en la alimentación ofrecida a los animales tendiendo a reducir la producción de metano, dióxido de carbono, sulfuro de hidrógeno y 3-metilindol propenderán a corregir alteraciones metabólicas durante el proceso de fermentación ruminal, evitar trastornos de índole nutricional y mejorar la eficiencia de utilización del alimento consumido. Para alcanzar estas metas es imprescindible caracterizar los nutrientes de los alimentos y sus vías metabólicas. Algunas alternativas para este fin son los estudios a través de métodos *in vivo*, *in situ* e *in vitro*. Dentro de las técnicas *in vitro*, el método de uso más frecuente es la descrita por Tilley y Terry (1963), quienes determinan la digestibilidad aparentes de los alimentos. Años más tarde,

Goering y van Soest (1970), modifican algunos pasos de la técnica logrando obtener la digestibilidad verdadera de la materia seca (MS). Si bien estos avances fueron importantes en la nutrición animal, el inconveniente se presentaba en la falta de información sobre la cinética de digestión. La metodología *in situ* de la bolsa de nylon (Orskov *et al.*, 1979) supera esta limitante al proporcionar estimaciones de la tasa y la dinámica de la degradación de los constituyentes del alimento; sin embargo, es una aproximación laboriosa, costosa e invasiva, en la que solamente un pequeño número de muestras pueden ser evaluadas simultáneamente (Mohamed y Chaudhry, 2008). Aparece en los últimos años, el método *in vitro* de Daisy (Ankom, 2000) que superaría estas limitantes encontrándose en etapas de estandarización. Sin embargo, las determinaciones son por diferencia de peso limitando la cuantificación de los compuestos solubles (Pell *et al.*, 1998). La técnica de producción de gases al determinar la extensión y cinética a través del volumen de gas producido durante el proceso fermentativo (Theodorou *et al.*, 1994) corregiría lo arriba mencionado. El gas producido durante el proceso de fermentación de los alimentos representa la suma de la descarboxilación oxidativa del piruvato, y el resultado de la reacción de la saliva con los AGV. El gas directo (CO₂ y CH₄), se produce principalmente cuando el sustrato es fermentado hasta acetato y butirato, mientras que la producción de propionato sólo genera gas indirecto. Por tanto, las variaciones en la proporción de los diferentes AGV relacionadas con el tipo de sustrato fermentado, deberían dar diferencias en el volumen de gas (Ammar *et al.*, 2008). Además, la alta concentración de N-amoniaco disminuye la liberación de gas debido a la basicidad del medio ruminal (Cone *et al.*, 2002), de acuerdo a resultados obtenidos en ensayos *in vitro* con alimentos concentrados en hidratos de carbono no estructurales (HCNE), y otros con alto valor proteicos.

Las investigaciones desarrolladas en este trabajo tienden a fortalecer la resiliencia de los sistemas productivos pecuarios en base a estrategias de adaptación y mitigación nutricional, en búsqueda de satisfacer la creciente demanda de alimentos de origen pecuario, con recursos cada vez más limitados. Consientes que la cuantificación *in vivo* de las emisiones de CH₄ entérico son esenciales para decidir y evaluar estrategias sustentables, se han generado un gran volumen de estudios publicados que excede la capacidad de los sistemas de control de calidad científicos y la de los especialistas para valorar, interpretar y adoptar críticamente sus resultados, sumado a las confusiones en metodologías y unidades de expresión, por todo ello, nuestro

objetivo es contribuir al conocimientos de la dinámica de gases de fermentación entérica, y por ende, en la productividad y medio ambiente.

Capítulo 2:

ESTIMACIÓN DE LA PRODUCCIÓN EMPÍRICA DE METANO

2.1 INTRODUCCIÓN

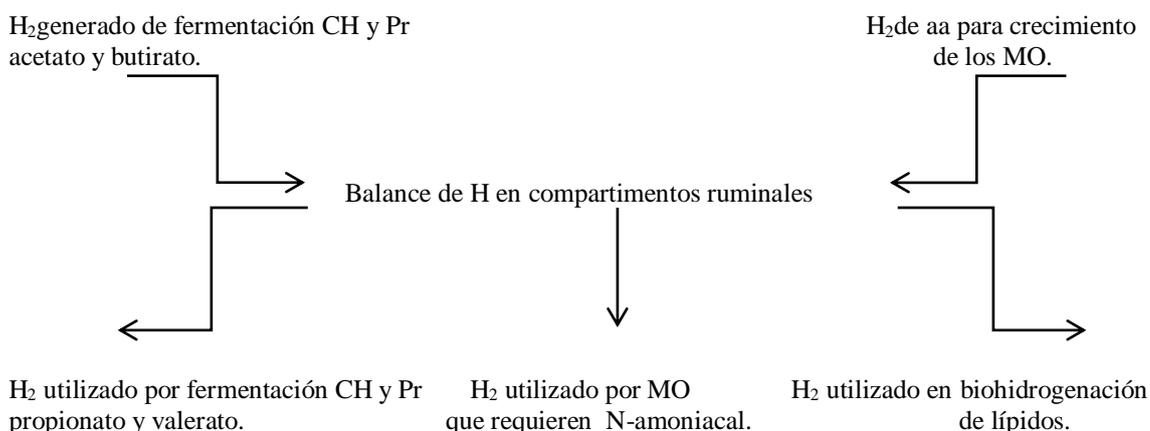
En 1997 se aprobó el texto del Protocolo de Kyoto (PK) en el que se establecieron límites para los distintos gases de efecto invernadero, así como el compromiso de los países desarrollados y otros (incluyendo el nuestro), a evaluar y cuantificar las concentraciones de estos gases, como también, a desarrollar técnicas para reducirlos. De acuerdo con la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), la actividad ganadera genera aproximadamente 7.1 gigatoneladas de dióxido de carbono al año, 14.5% de las emisiones de gases de efecto invernadero (GEI) inducidas por la actividad humana (Gerber *et al.*, 2013). Las emisiones liberadas a la atmósfera por la actividad ganadera son óxido nitroso, metano y dióxido de carbono, siendo las principales fuentes de emisión la fermentación entérica o producción de metano por el proceso digestivo de los rumiantes, de allí que las ecuaciones de predicción se fundamentan en el balance estequiométrico de las reacciones de fermentación del alimento consumido. Existen numerosos modelos en base a distintos parámetros químicos y físicos. Del análisis de varios experimentos sobre la emisión de CH₄ con distintos tipos de dietas, se determina como cada dieta, a nivel de mantenimiento de consumo, la producción de CH₄ se incrementa en forma directa a su digestibilidad aparente. La primera de las ecuaciones de predicción, que se usó de referencia por varios años, fue la obtenida por Moe y Tyrrel (1979), debido a que consideraba el consumo de hidratos de carbono (HC). Más recientemente, una importante revisión bibliográfica permitió a Ellis junto a colaboradores en el 2008, la obtención de regresiones propias para estimar metano a partir de distintos componentes de las raciones, las cuales fueron utilizadas en varios trabajos científicos para estimar la emisión de CH₄. Actualmente las ecuaciones de predicción de mayor peso, son las publicadas por el grupo de expertos del Panel Intergubernamental de Cambio Climático (IPCC).

Las Directrices del IPCC proporcionan los mejores métodos para la elaboración de inventarios nacionales de GEI debido que abarcan prácticamente todas las fuentes, y

proporcionan métodos alternativos de complejidad diferente y con distinta necesidad de datos, dándose orientación en cuanto a su elección. Además, se han elaborado con la intención de que puedan aplicarse en todos los países (se facilitan tanto los métodos como los datos por defecto y son amplio examen para que puedan aplicarse de la manera más extensa posible. La elaboración de los Inventarios de las Emisiones de GEI que los países firmantes del PK, encuadrados en el anexo 1, tienen la obligación de presentar a la Convención Marco de las Naciones Unidas sobre el Cambio Climático (CMNUCC), deben seguir las directrices del IPCC. Este organismo, se encarga de estudiar y gestionar la difusión científica sobre el calentamiento global, determinar las acciones que han dado pie al calentamiento global, en búsquedas de alternativas de adaptación y mitigación de este cambio. En constante estudio, sus publicaciones han ido evolucionando, siendo la primera las Directrices revisadas del IPCC de 1996 para los inventarios nacionales de gases de efecto invernadero; luego, Orientación IPCC del 2000 sobre las buenas prácticas y la gestión de la incertidumbre (GPG-2000), le sigue, Orientación IPCC del 2003 sobre las buenas prácticas relacionadas con el uso de la tierra, el cambio del uso de la tierra y la silvicultura (GPG-UTCUTS) y finalmente, las Directrices IPCC del 2006 para los inventarios nacionales de gases de efecto invernadero. En esta última, se clasifica a las actividades en: 1) energía; 2) procesos industriales y uso de productos; 3) agricultura, forestación, y otros usos de la tierra; y 4) residuos. La estimación de las emisiones se basa en datos de la actividad sobre la magnitud de una actividad humana que determina emisiones/absorciones de GEI durante un cierto período de tiempo; derivados habitualmente de estadísticas, y el factor de emisión, que corresponde a la tasa promedio de emisión de un determinado GEI, relativa a la unidad de los datos de actividad. Para todos los sectores se plantean enfoques metodológicos de estimación de los gases que varían en la complejidad de los detalles en los distintos niveles. En orden ascendente de precisión, para las actividades del sector ganadero, se propone nivel 1 (N1), nivel 2 (N2) y nivel 3 (N3). Un enfoque sencillo a partir de un árbol de eventos de los cuales es posible calcular la energía bruta destinada al mantenimiento y producción de los animales, en base a valores por defecto, se obtienen valores para N1. El N2 es el llamado el método de balance de masas, y requiere de datos específicos como la de energía bruta (EB) consumida por el animal y el factor de conversión de CH_4 (Y_m). Su aplicación la realizan aquellos países donde el ganado de fermentación entérica es fuente clave, es decir, representa una proporción considerable del total de emisiones indicadas en los Inventarios de GEI. Aquí, los

factores de emisión se estiman para cada categoría animal empleando datos específicos del sistema productivo, sin embargo, el uso de valores fijos, como el caso de Y_m , afecta la precisión en la predicción, introduciendo errores en el dato de estimación (Ellis *et al.*, 2010). Ambos niveles (N1 y N2), presentan como limitante principal, la incapacidad de evaluar estrategias de mitigación sobre escala a nivel predio (Schils *et al.*, 2007). En la búsqueda de optimización, surge en los últimos años, la metodología N3, conocido como el método de evaluaciones rigurosas de fuentes específicas. Esta, aplica el desarrollo de patrones sofisticados que consideran los detalles de la composición, concentración de productos de la fermentación y variaciones estacionales en la población animal, entre otros factores. Focalizando para este nivel en la fermentación ruminal, actualmente existen varios modelos de predicción de CH_4 los que varían en complejidad. Se distinguen modelos mecánicos de empíricos, estadísticos de dinámicos, o las combinaciones entre ellos. El modelo de Dijkstra y colaboradores (1992), se considera el punto de partida para sucesivos estudios, posteriormente Mills (2001), adiciona el balance de hidrógeno, sumándole Bannink (2005), a través de estudios con su grupo de investigación la interacción entre el sustrato (alimento), microorganismos, fermentación y los productos finales. El esquema de Bannink, indica la interacción de 3 grupos de microorganismos (MO), bacterias amilolíticas, celulíticas y protozoos; y 4 sumideros de sustratos (es donde se dirigen los nutrientes de acuerdo al tipo de alimento y MO atacante): amoníaco, proteína soluble, hexosa amilolítica y hexosa celulítica. La fermentación de HC y proteínas genera, acetato, butirato y el crecimiento poblacional de MO que utilizan aminoácidos (aa), en todas las actividades se genera H_2 . Por el contrario, en la producción de propionato y valerato, se utiliza H_2 para la fermentación de HC y proteína (Pr). También es utilizado para la hidrogenación de cadenas de ácidos grasos insaturados proveniente de la ingesta de lípidos y el crecimiento de MO que recurren al nitrógeno como fuente para la síntesis de proteína. El modelo de Bannink supone un valor neto de hidrógeno (H_y) resultante de la resta del H_2 producido versus utilizado; de gran interés para nuestro estudio ya que será la materia prima para las arqueas metanogénicas en la generación de metano.

FIGURA 3: Balance del Hidrógeno (H₂) del modelo de Bannink y otros (2005).



Por medio de la Ecuación 1 se estima la producción de CH₄, donde se asume la necesidad de 4 moles de hidrógeno para producir un mol de metano y siendo su calor de combustión de 0,883 MJ (Benchaar *et al.*, 1998).

$$CH_4 = (H_y * 4^{-1}) * 0.883$$

CH₄: MJ*d⁻¹; H_y: Hidrógeno neto

Ecuación 1

El CH₄ es un potente gas con efecto invernadero, presentando un potencial de calentamiento de la Tierra aproximadamente 21 veces superior al del CO₂ (Moss *et al.*, 2000), existiendo actualmente grandes controversias entre investigadores sobre esta valor. Como se explica en el capítulo 1, las actividades agropecuarias contribuyen a la emisión de gases de efecto invernadero, siendo los rumiantes aportantes naturales a la acumulación de metano a través de la fermentación ruminal y descomposición anaeróbica de sus heces (Smith *et al.*, 2007; Lassey, 2008). Por otro lado, las características de la dieta tienen un gran efecto en la producción de gas metano a nivel global, de ahí que países con pocas limitaciones alimentarias para sus ganados con predominio de actividades intensivas, reportan datos de menores emisiones de gas metano y mayores eficiencias energéticas (Kinsman *et al.*, 1995). Siguiendo las directrices que propone IPCC, la Segunda Comunicación Nacional de GEI con base al año 2000 presentada por el gobierno de la República Argentina a la CMNUCC resultó en 238.702,89 Gg.CO₂eq, indicando que el 35.79 % (85.433,43 Gg.CO₂eq) corresponde

a metano (CH₄), a partir del cual el 69.68% lo origina el sector agropecuario, principalmente por fermentación entérica (SCN, 2007). En comparación con las emisiones mundiales, Argentina participa en menos de 1% del total, sin embargo, en más de un 3% en lo que se refiere a CH₄ entérico. Este aporte relevante del sector agropecuario en las emisiones de GEI, refleja el perfil productivo del país. (Berra *et al.*, 2000). En la Tabla I se sintetizan las emisiones de los GEI, discriminado por gas y categorías de fuentes, informadas por la Fundación Bariloche correspondiente al Inventario Nacional en la 2ª Comunicación Nacional base año 2000 de Argentina.

Tabla I: Emisiones de gases de efecto invernadero de argentina en Gg CO₂ eq. discriminada por gas y categoría de fuente.

Año 2000	CO₂(1)	CH₄	NO_x	HFCs	PFCs	S₆F	Total
Energía	118.712,02	12.240,46	1.008,46				131.960,94
Proc. Ind.	9.611,85	26,99	145,36	947,48	326,10	49,93	11.107,71
Agr/Ganad		59.533,22	65.386,17				124.919,39
CUSS	-43.940,88	583,78	59,25				-43.297,85
Desechos		13.048,98	963,74				14.012,72
T Netos ⁽¹⁾	94.389,99	85.433,83	67.562,97	947,48	326,10	49,93	238.702,89

CUSS: Cambio en Uso de Suelo y Silvicultura. CO₂: Dióxido de Carbono. CH₄: Metano. NO_x: Óxidos de Nitrógeno. HFCs: Hidrofluorocarbonos. PFCs: Perfluorocarbonos. S₆F: Hexafluoruro de Azufre

(1) Para emisiones de CO₂ correspondientes a CUSS se reportan las Emisiones Netas.

Para los propósitos del informe los signos para capturas son negativos (-) y para emisiones positivos (+)

En el tomo III del Inventario Nacional de la República Argentina del año 2000 se informan las emisiones correspondientes a ganadería. Al analizar el perfil de los tres principales GEI: CO₂, CH₄ y N₂O, la ganadería aporta el 45.5 %, 30.1 % y 23.9 % respectivamente, el cual al compararlos con países desarrollados (70% para CO₂ y 15% para cada uno de los gases restantes), muestra el peso del sector ganadero en nuestro, y el elevado consumo de combustibles fósiles de los otros países. Focalizando en la provincia de San Luis, por ser pionera en políticas ambientalistas, adhiriéndose al Programa de Protocolo de Kyoto, con el fin de instrumentar políticas que contribuyan a la captura de dichos gases (Decreto N° 6314-MLyRI), y al cambio que ha sufrido en los últimos años el sistema ganadero, se realizó un estudio de la provincia en dos etapas, la primera analizando el impacto en la aplicación del nivel de complejidad de las metodologías de cálculo en la estimación de CH₄ entérico, a través de los modelos empíricos N1, N2 y N3 de referencia del IPCC. En la segunda etapa, aplicando el N2, se origina el inventario de CH₄ entérico de la provincia de San Luis (Guzmán *et al.*, 2013), con el objeto de estudiarla evolución en relación al stock ganadero y eficiencia de los sistemas productivos (kgCH₄*kg producto⁻¹).

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1 COMPARACIÓN DE NIVELES METODOLÓGICOS

Para comparar los 3 niveles metodológicos se simuló un sistema ganadero bovino de ciclo completo típico para la zona sur de la provincia de San Luis (Departamentos Pedernera y Dupuy). El proceso de producción se basa en tres etapas: subsistemas de cría, de recría y de terminación o de engorde a corral. En la Tabla II se detallan los principales parámetros del ciclo productivo y las características químicas de los alimentos que se tuvieron en cuenta para este trabajo.

Para la etapa de cría, se asume que la alimentación del ganado es en base a pastizales naturales, el sistema obtiene un destete del 70%, una reposición del 20% y para los datos de calidad de la dieta, se determinaron en el Laboratorio de Análisis de Alimentos para Rumiantes de la EEA San Luis, y para los valores de degradabilidad se consulta bibliografía del National Research Council (NRC, 1996), conjuntamente con Gibbs y Johnson (1993).

Se estimaron las emisiones de CH₄ provenientes de la fermentación entérica en base a aplicación de las metodologías del IPCC (2006).

2.2.1.1 Nivel 1 (N1)

2.2.1.2 Nivel 2 (N2)

2.2.1.3 Nivel 3 (N3)

2.2.1.1 Para N1 se consideró la ingesta de alimento de un animal Aberdeen Angus de 360 Kg de PV, utilizando el FE propuesto por defecto establecidas en el anexo 10A.1, del Volumen 4 correspondiente a las Directrices IPCC, (2006). Los datos simulados corresponden a un total de 1352 animales, estimando la emisión aplicando diferentes ecuaciones

Tabla II: Parámetros productivos y químicos de Sistema Ganadero en San Luis

Etapa	Categoría	Periodo	Peso Medio Kg	Cab.	Ración Diaria	GPV Kg/d	PB % MS			FDN % MS			Almidón % MS		
							S	D	Kd	S	D	Kd	S	D	Kd
Cría	vaca, ternero y toros	siempre	400	785	Pastizal natural	0	6,5			75					
							15	77,5	9	0	87,5	6			
Recría	vaquillonas y novillos	12 meses	300	272	Pasturaimpl ant C4 y leguminosas	0,6	15			55			6,8		
							35	55	5	0	82,5	4			
Terminac	vacas cut, toros, vaquillon y novillos	3 meses	430	295	Silo maíz planta entera y grano maíz	1,33	14			35			63		
							32	62	6,5	0	85	7,5	57,5	42,5	10
							22,5	75	6	0	80	6	30	70	8

Cría: 70% destete, 20% reposición. Se asume que la explotación mantiene la misma cantidad de animales maduros todo el año.

Ternero/as destete precoz, por lo que no se considera en emisión de CH₄ enterico.

GPV: ganancia de peso vivo por día y animal. %PB: porcentaje de proteína bruta en base seca. %FDN: porcentaje de fibra detergente neutro en base seca. S: soluble. D= degradable. Kd= velocidad de degradación.

Fuente: LAAR (Laboratorio de Análisis de alimento de rumiantes de la EEA, San Luis). National Research Council (NRC 1996)

2.2.1.2- Para la aplicación de N₂ se definió subcategorías según la edad, tipo de producción, sexo y calidad de la dieta, buscando efectuar una estimación más exacta de la cantidad de energía (MJ*día⁻¹) estipulada por la demanda de los animales asociada su peso. La EB para N₂ se calculó sumando la fracción de energía necesaria para el mantenimiento, crecimiento, desarrollo y producción (Tabla III). El Ym es el factor principal para el cálculo de las emisiones de cada categoría. Las guías del IPCC establecen rangos de Ym basados principalmente en las digestibilidades de raciones, presentando como desventajas los insumos utilizados para el cálculo corresponden a los alimentos del hemisferio norte, de gran variabilidad, tanto en el tipo como calidad, con respecto a los de uso frecuente en nuestra zona. En la búsqueda bibliográfica se encontró la fórmula de Cambra-López (2008), quienes determinaron en base a regresiones tanto lineal como polinómica de trabajos publicados que aportaban datos sobre digestibilidad y producción de CH₄, una ecuación para determinar el Ym (Ec. 2).

$$Ym = -0.003 * ED^2 + 0.3501 * ED - 0.8111$$

Ecuación 2

Ym = expresado como la fracción de la EB del alimento que se transforma en CH₄

ED = Digestibilidad de la ración en función a la EB (%)

$$FE = Consumo EB * Ym * 365 * 55.65^{-1}$$

Ecuación 3

FE: factor de emisión en CH₄, kg*año⁻¹

EB: Energía bruta, en MJ*día⁻¹; Ym: Factor de conversión de la EB consumida en CH₄

$$CH_4 = FE * N^{\circ} animales$$

Ecuación 4

Emisión de CH₄: Emisión de CH₄, kg*año⁻¹*animal⁻¹

FE: factor de emisión en CH₄, kg*año⁻¹

Tabla III: Ecuaciones utilizadas para calcular Energía Bruta (EB)

Energías constituyentes de la EB

$$ENm = Cfi * (\text{Peso})^{0,75}$$

$$ENa = Ca * ENm$$

$$ENc = 22,02 * (PP * ((Cs * PA)^{0,75} * (AP)^{1,097})^{-1}$$

$$ENl = \text{Kg. Leche} * \text{día}^{-1} * (1,47 + 0,40 * \text{Grasa})$$

$$ENp = \text{Cpreñez} * ENm$$

$$REM = 1,123 - (4,092 * 10^{-3} * ED) + [1,126 * 10^{-5} * (ED)^2] - (25,4 * ED^{-1})$$

$$REG = 1,164 - (5,160 * 10^{-3} * ED) + (1,308 * 10^{-5} * (ED)^2) - (37,4 * ED^{-1})$$

NRC (1996) / Gibbs y Johnson (1993)

2.2.1.3 Para el N3 se utilizó el modelo estequiométrico de Bannink *et al.* (2011), en base a la dieta, se dividen los componentes de la MS en almidón, celulosa, hemicelulosa, proteína cruda y la fracción soluble de los carbohidratos determinados por diferencia de las fracciones antes mencionadas. Se estimó la producción de AGV aplicando la última modificación de Mills y colaboradores. (2001), obteniendo la cantidad de H₂ en rumen para el cálculo de CH₄.

2.2.2. INVENTARIO SAN LUIS DE GASES DE FERMENTACIÓN ENTERICA

El trabajo del consistió en recopilar y analizar la información sobre las emisiones de CH₄ procedentes de la fermentación entérica de San Luis. Aplicando N1 se realiza el análisis en la tendencia de emisión desde 1993 hasta 2009. Los valores del stock del ganado bovino corresponden a información aportada por la Red de Información Nacional Agropecuaria (RIAN) y encuesta Nacional agropecuaria (ENA) realizada por INDEC y datos de SENASA, 1° Campaña de vacunación antiaftosa (2003-2009).

Para la realización del Inventario de San Luis a través del nivel 2, se determinara:

2.2.2.1-Parámetros bovinos según sistema productivo de la provincia de San Luis.

2.2.2.2 Energías constituyentes de la energía bruta (EB)

2.2.2.3 Factores de emisión (EF)

2.2.1.4 Emisión de CH₄ entérico.

2.2.2.1 La descripción de la población y producción bovina de la provincia de San Luis, base para la realización del inventario, corresponde al año 2009. Los valores del stock 2009 del ganado corresponden a datos aportados por la Red de Información Nacional Agropecuaria (RIAN). En lo referente a la alimentación de los bovinos, se utilizaron valores representativos de la zona, tanto en la digestibilidad de las pasturas, como dietas de uso frecuente, caracterizando cada situación de acuerdo a las regiones ganaderas determinadas por Frasinelli (2003), y considerando la producción variable de los forrajes a lo largo del año, por ser la principal fuente de alimentación. En la Tabla IV se presentan los parámetros característicos de los sistemas vigentes en la provincia de San Luis.

Tabla IV: Parámetros del animal y alimentos característicos de San Luis

	Vaca	Novillitos	Novillo	vaquillona	toro
PV (kg)	400	250	300	270	550
AP (kg*día⁻¹)	0	0.7	0.5	0.3	0
PM	89.44	62.87	72.08	66.6	113.57
PA (kg)	420	300	400	400	650
Leche(kg*día⁻¹)	3				
Grasa (%)	3.5				
Dig. (%)	55	68	65	65	55

Elaboración propia en base a Directrices IPCC (2006).

PV: Peso Vivo; es el peso corporal vivo promedio de los animales de la población.

GP: Ganancia de Peso; aumento de peso diario promedio de los animales de la población.

PM: (kg^{0.75}) Peso Metabólico.

PA: Peso Adulto; peso corporal vivo y maduro en condición corporal moderada.

Leche: producción de leche promedio por día.

Grasa: contenido de grasa de la leche.

Dig: digestibilidad del alimento.

2.2.2.2 En función a los cuantificaciones del animal característicos de la provincia de San Luis (Tabla IV), y empleando los coeficientes (Tabla V) y ecuaciones de cálculo establecidos por Nacional Research Council, 1996 (Tabla III), se determina la Energía Bruta (Ec.5)

$$EB = ((ENm + ENa + ENl + ENp + ENt)REM^{-1}) + (ENC * REG^{-1})ED * 100^{-1}$$

Ecuación 5

La Energía Bruta (EB) se obtiene en base a las energías constituyentes, Energía de mantenimiento (ENm), de actividad (ENa), de crecimiento (ENC), de la producción de las hembras, como lactancia (ENl) y preñez (ENp). Otros factores que afectan el valor de la EB son la relación entre la energía neta disponible en la dieta para

mantenimiento y la energía digerible consumida (REM), y la relación entre la energía neta disponible en una dieta para crecimiento y la energía digerible consumida (REG).

Tabla V: Coeficientes utilizados para cálculos de Energías Netas

	Vaca	Novillitos	Novillo	Vaquillona	Toro
Cfi	0,335	0,322	0,322	0,322	0,37
Ca	0,36	0,17	0,36	0,36	0,36
Cs	0,8	1	1	0,8	1,2
Cp	0,1			0,1	

NRC (1996)

Cfi: coeficiente para el cálculo de ENm, varía para cada categoría de animales.

Ca: coeficientes de actividad, correspondiente a las condiciones de alimentación del animal

Cs: coeficiente sexo

Cp: coeficiente de preñez

2.2.2.3 El factor de emisión (FE), definido por tipo de población ganadera (kg CH₄ cabeza⁻¹ año⁻¹), se obtiene a partir del valor de EB y factor de conversión de CH₄, como lo indica la Ecuación 3. Se aplicó la ecuación de Cambra-López (2008) para la estimación de Ym (Ec.2).

2.2.2.4 A partir del producto del número de animales por la sumatoria de cada categoría, se determinan las emisiones de metano total (Ec. 4). Las emisiones de CH₄ producidas por el sector ganadero se deben declarar en los inventarios en Gigagramos (Gg= mil toneladas) de metano, sin embargo, a los efectos de comparaciones del orden sectorial y/o fuentes de origen, se expresan también en millones de toneladas de carbono equivalente (MTCE) o Gg de CO₂ equivalente, debido a que el gas de referencia es el dióxido de carbono.

2.2.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los procedimientos estadísticos fueron realizados utilizando el programa estadístico R (<https://www.r-project.org/>). Los datos dentro de cada etapa se sometieron a un análisis de ANOVA y se utilizó el test de Tukey con un nivel de confianza de $p < 0,05$. El arreglo experimental en el análisis comparativo de los niveles es un diseño en bloques completos. En cada bloque (N1, N2 y N3) se evalúan todas las etapas del sistema (cría, recría y terminación). A los valores medios obtenidos de las metodologías N1, N2 y N3 se le realiza el análisis de varianza de Lawley-Hotelling (nivel de confianza de $p < 0,001$) para comprobar si el nivel de complejidad tiene alguna influencia sobre la variable sistema. Por tratarse de una estructura concentrada se eligió

como estadístico de contraste la Prueba de Hotelling. Se consideraron como variables dependientes las etapas del sistema productivo y como variable independiente el nivel metodológico. La hipótesis nula plantea que la variable independiente no tiene ningún efecto sobre la variable dependiente de forma conjunta.

2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las medidas de las emisiones de CH₄ entérico emitidos por la ganadería en un sistema productivo de carne típico de la provincia se muestran en la Tabla VI. Los valores expresados en MJ*d⁻¹, corresponden a la categoría ponderada para cada etapa de producción y nivel de complejidad.

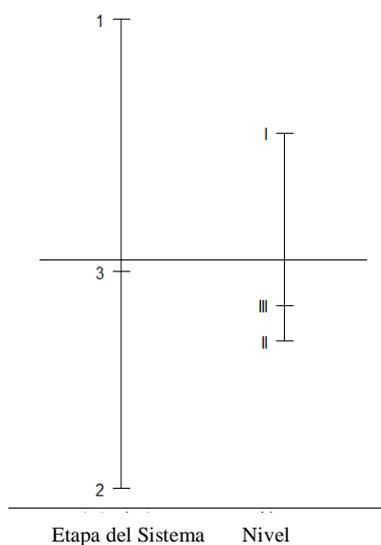
Tabla VI: Emisión promedio de CH₄ (MJ*d⁻¹) entérico en función a etapa productiva y metodología de cálculo

Método	Cría	Recría	Terminación	Total *
Nivel 1	183.87 A	77.30 A	208.26 A	
D.E.	55,67	4,32	20,67	469.42 A
CV	30,28	5.59	9.92	
Nivel 2	212.96 A	75.89 A	51.80 B	
D.E.	64,48	4,24	5,14	340.65 B
CV	30.28	5.59	9.92	
Nivel 3	143.01 A	96.25 B	123.73 C	
D.E.	10.23	5.55	4.71	362.94 B
CV	5.23	4.78	8.78	

Medias con una letra distinta en columna son significativamente diferentes (p< 0,05)*Lawley-Hotelling:
Medias con una letra distinta en columna son significativamente diferentes (p<0.001)

En la Figura 4 se exhiben, en forma descriptiva, los promedios de los factores con respecto de la media global. Desde una perspectiva metodológica, el N 1 (bloque I) es el de mayor emisión y más se aleja de la media. Con respecto a la etapa de producción, en la cría (tratamiento 1) se produciría mayor cantidad de CH₄ entérico.

FIGURA 4: Promedios de los factores con respecto a la media global. Comparación de los resultados promedios de tratamientos (sistemas productivos) y bloques (niveles metodológicos).



Etapa del sistema: 1=cría, 2=recría, 3=terminación
 Niveles: I= N1, II= N2, III= N3

Para determinar si el nivel de complejidad en la determinación de gas tuvo efecto sobre las diferentes etapas de producción, de la generación de matrices de sumas y cuadrado, vectores medios de grupos y de covarianzas, se realizó el análisis de varianza de Lawley-Hotelling, indicando diferencias significativas ($p < 0.001$) entre los N3 y N2 con N1. A posteriori se realizó la prueba de Prueba Hotelling Alfa=0,05. El valor mayor se obtiene con N1 metodología más simple, y menor para N2 ($340,65 \text{ MJ} \cdot \text{d}^{-1}$). Se observa en la etapa de terminación el mayor valor $208.26 \text{ CH}_4 \text{ MJ} \cdot \text{d}^{-1}$ estimado por el N1 y a su vez el menor valor $51.80 \text{ CH}_4 \text{ MJ} \cdot \text{d}^{-1}$ con N2, lo que indica diferencias estadísticamente significativas en la misma etapa del sistema (terminación). Contrariamente, en la etapa de cría los valores obtenidos fueron semejantes, no expresando diferencias significativas ($p=0,0493$). Para el caso de la recría, difirió estadísticamente ($p < 0,001$) solo el N3. En la Tabla VII se muestran los precursores para el cálculo de CH_4 entérico. El FE es el precedente en las metodologías N1 y N2, que surge a partir de valores promedios de EB consumida por cada categoría para N2 y se obtiene por defecto en tablas de las directrices del IPCC, para N1. En el caso de N3, el precursor es la producción de moles totales de AGV por día, ponderando un valor medio en función a la ración de la etapa de producción. La información indica que en ciertas dietas donde se observa un aumento en el consumo de MS debido a la mejora en

la digestibilidades que generan un cambio en la proporción de AGV, de acetato a propionato, coincidiendo también, con un incremento de la tasa de pasaje, disminución de la degradación de la fibra y baja en pH ruminal (Robinson *et al.*, 1986), todo esto conllevaría a una eficiencia en el sistema, como lo observado en este trabajo. Si bien la producción de CH₄ es mayor en la etapa de terminación, al expresarlo en función del producto final, se reinvierte el orden, siendo 2.91 kg CH₄*kg carne⁻¹ en recría y 1.68 kg CH₄*kg de carne⁻¹ en terminación.

Tabla VII: Precursores de Emisión CH₄ entérico: FE para N1, N2 y AGV para N3

Etapa	FE Kg CH ₄ *cab ⁻¹ *año ⁻¹		AGV mol*100 mol ⁻¹		
	Nivel 1	Nivel 2	Acético	Butírico/Valérico/otros	Propiónico
Cría	56	86,48	20.66	2.36	3.80
Recría	49	48,59	16.27	3.93	7.24
Terminación	63,4	17,34	20.19	4.01	8.34

FE: factor de emisión. AGV: ácidos grasos volátiles.

Según estudio de Bannink (2011), la incertidumbre de N3 se considera de alrededor del 15%. El principal factor de error es la estimación de consumo, seguida por estequiometría en la producción de AGV y acidificación del contenido ruminal. En la comparación de los niveles metodológicos, se eliminarían factores de variabilidad entre los niveles de menor complejidad, debido al uso del mismo valor en los componentes de las fórmulas, aumentando la exactitud al remplazar con valores reales parámetros que son estimados por fórmulas matemáticas en los niveles menores, como el caso del consumo. Al analizar los coeficientes de correlación de N3 con N1 (Pearson= 0.83) y, N3 con N2 (Pearson= 0.72), indicaría, si consideramos el resultado de N3 como el más exacto, que la metodología N1 es más certera que N2, no coincidiendo con lo planteado por expertos del IPCC. Los resultados del sistema total mostraron diferencias significativas (p<0,001), determinando el mayor valor (469.42 MJ*d⁻¹) con la metodología más simple, nivel 1 y menor para N2 (340.65 MJ*d⁻¹). En la Tabla VIII se observan las emisiones diarias de CH₄ expresadas en mega joule por día (MJ*d⁻¹) de cada categoría ponderada para cada etapa de producción y nivel de complejidad. Detalladamente, al considerar cada etapa, se observa en la cría que ambas metodologías básicas sobreestiman la producción de CH₄, quizás al determinarse por valores estimados en función de fórmulas, no se considera el efecto de la actividad de los MO en rumen, como sus productos metabólicos y la eficiencia de utilización del animal huésped. Contrariamente, en la recría el valor se reinvierte, subestimado la emisión.

También aquí, se pone en evidencia la importancia de las bacterias ruminales en la producción animal, si bien la producción de CH₄ entérico por animal es mayor, al expresarla por unidad de producto final es menor, como se lo describió en varias investigaciones con este tipo de dietas (Moss *et al.*, 2000; Mills *et al.*, 2001). Por otro lado, Bannink (2011) mostró que una reducción de 0.1 de pH causado por una menor degradación de las fibras, genera un cambio en los patrones de fermentación, entre ellos, aumento en la concentración de ácido propiónico, lo que afectó la emisión en un 3%, lo que explicaría la menor producción de N₃ con respecto a N₁. El bajo valor de N₂ en terminación no sería una de las limitantes, debido a que la metodología de cálculo para la fase terminación hace hincapié en otros procesos que contribuyen simultáneamente, tal es el caso de las emisiones producidas por el estiércol en su almacenamiento y manejo. La capacidad de representar la mecánica de fermentación del N₃ con más detalles que N₂, permite describir las variaciones causadas por factores nutricionales y del animal, resultando una mejora en la estimación de la emisión, como también, provee ideas del peso de los diferentes factores en la incertidumbre. Basados en la bibliografía, el N₃ es una herramienta de investigación que nos permite evaluar distintas opciones nutricionales para reducir en efecto contaminante, y también la eficiencia de conversión del animal. Al considerar N₃ parámetros ruminales, el efecto del consumo de MS y condiciones de fermentación como el pH, los cuales como ya han demostrado varios autores (Bannink *et al.*, 2010; Ellis *et al.*, 2008) provoca efectos en la metanogénesis ruminal, determinando distintos porcentajes de producción en los AGV como se observó en Tabla VII. Algunas de las limitantes es la complejidad de los mecanismos de fermentación que requieren información detallada de la dieta, características de la degradabilidad del alimento para lo cual debe ser analizada, aunque también se podría basar en previas incubaciones *in situ* o software de simulación de raciones sofisticados, como es nuestro caso, para lo cual también es necesario el análisis de parámetros de calidad nutricional como MS, PB, FDN, FDA, LDA para cargar en los programas. A medida que es más complejo, el modelo ayuda a mejorar la interpretación permitiendo generar hipótesis sobre la composición de dietas, cuantificar los cambios en la emisión de metano por las acciones tomadas. La estimación de CH₄ entérico a través del N₃ permitiría evaluar distintas opciones de manejo y decidir políticas de acción a través del entendimiento de los mecanismos. Sin embargo, al considerar que dichos valores son variables en base a la disponibilidad de la información, las mejoras en los resultados pueden diluirse en función del tiempo y costo para la obtención de datos, por lo cual se

debería analizar todo el contexto de acuerdo a los objetivos planteados, ya que, como vimos, los modelos muestran una gran dispersión, reflejando la sensibilidad a los factores de emisión, y por lo tanto, un alto nivel de incertidumbre, sugiriendo los resultados la continuidad de los estudios considerando la cantidad de factores que afectan la producción de metano de los rumiantes, para el diseño de estrategias.

Por otro lado, la emisión de CH₄ producto de fermentación entérica de bovinos no lecheros en la provincia de San Luis, correspondiente al número de hacienda del 2009, fue de 101.37 Gg CH₄ (2.128.82 GgCO₂eq = 0.580 MTCE) con la metodología N2. Para realizar la comparación entre la emisión entérica de Argentina respecto a San Luis, se aplicó la metodología N1 (Tabla VIII) debido a la falta de información sobre características productivas. Los resultados permiten observar la tendencia de la provincia, observándose en el último período un aumento en la emisión, representando un porcentaje superior al 3% en relación a los valores de 2-2.5% para la década del noventa.

Tabla VIII: Evolución de las emisiones de metano de origen entérico para Argentina y San Luis de acuerdo a los lineamientos del “Panel Intergubernamental sobre el Cambio Climático”, Nivel I, enGgCO₂eq.año⁻¹

	1993	1995	1997	1999	2001	2003*	2005*	2007*	2008*	2009*
Ar	61.922	61.915	58.869	57.691	57.449	67.326	68.721	70.227	70.755	65.625
S.L	1.355	1.425	1.334	1.272	1.427	1.985	1.888	2.130	2.258	2.289

Elaboración propia en base a censos de: INDEC, Encuesta Nacional Agropecuaria (1993-2001)*/SENASA, 1° Campaña de vacunación antiaftosa (2003-2009)

En la Tabla IX se presenta el inventario detallando las emisiones estratificada por Departamentos, expresada como el gas original y sus equivalencias.

Tabla IX: Emisiones de CH₄ procedentes de la fermentación entérica expresada como el gas original y sus equivalencias y estratificada por Departamentos. San Luis, 2009.

DEPARTAMENTO	GgCH ₄ año ⁻¹	GgCO ₂ eq	MTCE
Ayacucho	6.12	128.42	0.04
Belgrano	5.33	111.86	0.03
Chacabuco	6.44	135.23	0.04
Coronel Pringles	8.10	170.08	0.05
General Pedernera	26.14	548.95	0.15
Gobernador Dupuy	32.37	679.75	0.19
Junín	2.71	56.89	0.02
Capital	10.33	216.89	0.06
San Martín	3.85	80.75	0.02
Total San Luis	101.37	2128.82	0.58

Elaboración propia

Al utilizar factores globales por defecto, el N1 simplifica el cálculo de la emisión, es de gran utilidad cuando tenemos una información mínima, pero al tener un grado de incertidumbre mayor al 50% de acuerdo a los expertos del IPCC, no es conveniente para realización de inventarios, ni análisis regionales cuando se trata de especie clave. La diferencia en los resultados para San Luis entre N1 (Tabla VIII) y N2 (Tabla IX), coincide con los resultados de etapa anterior sobre comparación de niveles metodológicos, donde N2 resulta menor que N1 (Tabla VI), ello evidencia cómo el uso de información local y específica afecta los parámetros de cálculo, por ende, los resultados finales. Los valores obtenidos para la provincia de San Luis fueron menores en un 7.5% en relación con lo estimado a partir del procedimiento N1 (2128.82 vs 2289.40 Gg CO₂eq). Al realizar un estudio más crítico, de acuerdo a la caracterización por regiones ganaderas y tipo de actividad bovina desarrollada, la producción de metano es inferior en la actividad de invernada. Esto se observa al comparar el Departamentos Dupuy, que concentra su rodeo en la actividad cría y recria, y el Pedernera, que presenta un perfil ganadero invernador dado por la mayor relación novillo+novillito*vaca⁻¹ (Manazza e Iglesias, 2008). Desde el punto de vista de la eficiencia en la producción de carne, la categoría "novillitos" es la menos contaminante, porque genera 0.134 kg CH₄ emitido*kg de incremento en PV⁻¹, representado sólo el 21% de lo que genera la vaquillona (0.636 kg CH₄ emitido*kg de incremento en PV⁻¹). La incertidumbre disminuye más de un 25% con N2 (IPCC, 2006) utilizando el valor por defecto propuesto en las directrices; en el análisis de los sistemas de la provincia, se calcula Y_m, por lo cual se reduciría el error en la predicción, de acuerdo a lo estipulado por Ellis y otros (2010).

2.4 CONCLUSIONES E IMPLICANCIAS

La tendencia a nivel mundial es la mejora de los valores de producción, a través de la incorporación de la mecánica y dinámica de fermentación en los modelos de predicción de gases, se busca mayor precisión en los factores de emisión. El N3 difiere del 2, por el avance en la predicción de fuentes generadoras y sumideros de H₂, sin embargo, la menor incertidumbre en las emisiones por metodologías más complejas, conlleva a la necesidad de mayor cantidad y calidad de datos bases, los cuales no están actualizados o se deben producir, generando una labor extra en tiempo y costo. La estimación de la emisión entérica a través del N3 permitiría evaluar distintas opciones

de manejo en relación a la dieta y el animal, decidiendo a través del entendimiento de los mecanismos acciones más correctas. La mejora en la práctica agronómica a través del uso de tecnologías que pueden ser aplicadas inmediatamente, como es el caso de buen manejo de servicio mejorando la tasa de preñez, parición y destete, es una oportunidad que puede reducir los GEI en un 10%, de acuerdo a lo encontrado por Weiske y grupo de investigación (2006); dependiendo de condiciones locales, necesitando información específica para evaluar las mejoras apropiadamente. Al considerar la disponibilidad de la información, las mejoras en los resultados de N3, pueden diluirse en función del tiempo y costo de información específica para la realización de inventarios de GEI, por ello es que se realiza con N2. Aunque existe gran variación en los resultados de los modelos, como se vio en resultados de comparación de metodologías, la utilidad de cada nivel estará en relación al objetivo del estudio.

Capítulo 3:
METODOLOGÍA DE MEDICIÓN *in vivo* DE PARÁMETROS
RUMINALES

3.1 INTRODUCCIÓN

Los alimentos ingeridos se transforman en el rumen en moléculas menores que son transferidas al animal a través de la absorción por la mucosa; la hidrólisis producida por enzimas, ya sea propia del animal, o de origen microbiano es el primer paso para la degradación. Los rumiantes y otros animales considerados pseudo-rumiantes, presentan una cámara fermentativa en la primera porción del sistema digestivo que le permita ser más eficiente en la utilización de las paredes celulares de las plantas, compuesta principalmente por HC. La fermentación de la glucosa se da principalmente por un proceso oxidativo bajo condiciones anaeróbicas, comenzando con la vía de Embden-Meyerhof, resultando el co-factor NADH reducido, necesitando regenerarse para completar la fermentación del azúcar. Esta oxidación se produce por organismos metanogénicos, transfiriendo un electrón a un aceptor distinto del O₂ favorecida por las condiciones de ausencia de luz y presencia de nitratos (NO₃²⁻), azufre (S) y sulfatos (SO₄²⁻). En el rumen las bacterias están sujetas a un pH cercano a 7; estado óptimo para producción de CH₄ (Church, 1993), lo cual explica que el 87% o más se genera allí. Calsamiglia y colaboradores (2009), encontraron una alta interacción entre el pH y las dietas suministradas, donde la adición de concentrados hasta un 40% disminuyó el pH y aumentó la producción de ácido propiónico, lo que condujo a la disminución en la formación de CH₄. En la última década los gases de efecto invernadero empiezan a jugar un papel importante en los temas de discusión internacionales; al ser el metano uno de ellos, se ha estimulado su investigación.

3.1.2 MÉTODOS DE MEDICIÓN DE CH₄

Actualmente existen diferentes sistemas de medición como las técnicas de espectroscopia infrarroja, cromatografía de gases, espectroscopia de masa, diodo laser, cámara respiratoria y hexafluoruro de azufre (SF₆). Sin embargo, se considera como método de referencia las cámaras cerradas que miden sólo metano, las cuales requieren animales entrenados y presenta alto costo, pero como ventaja provee información de la

variabilidad de las emisiones durante el día por animal y entre animales. Actualmente, la comunidad científica considera la técnica del SF₆ como un método indirecto de alta correlación con las cámaras. La misma se basa en la liberación de una cantidad de gas conocida contenido en un tubo permeable previa calibración, ubicado en el rumen, determinando la emisión de metano en relación de este gas en muestras representativas del aire expirado por los animales de prueba (Johnson *et al.*, 1994). El SF₆ es el gas trazador más empleado, este debe cumplir ciertas características, como es una tasa de liberación medible, constante y no afectar la fermentación ruminal. Se coloca un cabestro que sostiene un capilar sobre el morro, a través del cual se colecta muestra de aire expirado y éste es almacenado en un tubo al vacío colocado alrededor del cuello del animal (canister). Posterior a la colección de aire expirado, el tubo se presuriza con nitrógeno y se determinan las concentraciones de SF₆ y CH₄ por cromatografía. Debe conocerse la tasa de liberación del gas antes de su inserción en el rumen. Esta técnica tiene la ventaja de que se puede obtener información individual de los animales en condiciones normales de pastoreo, sin embargo, están asociadas a mayor variación que las técnicas calorimétricas estandarizadas. Sin embargo, el SF₆ presenta un potencial de calentamiento global 23900 veces superior al CO₂, y con una vida media de 3200. Otra forma de cuantificación consiste en utilizar una cámara dinámica (o de respiración) que mide las emisiones de animales rumiantes. Estos recintos cerrados disponen de al menos una entrada y una salida de gases por los que transita aire limpio de forma continua o discontinua, determinando las velocidades y direcciones que tomará el flujo de gas en el interior. La morfología tiende a ser más sencilla por cuestiones de facilidad de manejo, prevaleciendo las cámaras con forma cúbica (McGinn *et al.*, 2004; Wang y Huang, 2005), con uno o dos de los extremos de forma cónica, cuando se pretenden realizar experiencias con estiércoles o purines (Arogo *et al.*, 2003; Heber *et al.*, 2002). El tamaño o volumen de la cámara vendrá determinado en función del uso, para determinaciones de ganado vacuno existen cámaras de hasta 63,5 m³ (McGinn *et al.*, 2006). Los materiales constructivos empleados en la construcción de las cámaras varían en gran medida encontrándose cámaras de casi cualquier material (plásticos, metálicos, vidrio, etc.). En general, existe una tendencia a utilizar materiales ligeros y resistentes que faciliten el manejo del equipo (p.ej. PVC) (Leyris *et al.*, 2005; Smith *et al.*, 1995). En estudios con animales vivos, es habitual encontrar cámaras realizadas con cerramientos transparentes (p.ej., plexiglás) con el fin de reducir el estrés de los animales, además de poder observar su estado durante el experimento (Anexo 1). Otra

metodología, son el uso de máscara de circuito abierto, aquí los gases emitidos por el animal se recogen en bolsas que son analizadas en laboratorio donde se determinan las concentraciones de los gases (López *et al.*, 2011). Este método presenta la ventaja respecto a la cámara dinámica, que es más económico. Por el contrario, el uso de la máscara tiene diversas desventajas, el animal no puede comer ni beber mientras tiene la máscara puesta, no se pueden realizar mediciones significativas de emisiones de metano debido a la variación diaria normal y se subestima la producción de calor en un promedio de 9% (Johnson y Johnson, 1995). Otra alternativa son las máscaras que cubren la cabeza del animal entre los intervalos de que comió (Boadi *et al.*, 2002). Estas mediciones se hacían antes de los noventa para entender el metabolismo energético debido a que la eructación de metano representa una pérdida de energía. Como se indica, existen muchas técnicas para la cuantificación de las emisiones de metano procedentes de animales, sin embargo, son complejas y costosas. En este contexto, no resulta llamativo que la posibilidad de contar con alguna técnica alternativa de medición de emisiones de CH₄ entérico se haya convertido en una preocupación.

3.1.2.1- DETERMINACIÓN DE CH₄ *in vivo* EN ARGENTINA

El grupo de investigación GEI del Instituto de Patobiología del CICVyA en INTA encabezado por el Dr. Berra, viene trabajando en la determinación de metano entérico desde 2007. En ese lapso de tiempo se ha ido evolucionando en el desarrollo de diferentes metodologías; las primeras mediciones directas en bovinos se realizaron con micro-fístulas de rumen colectando los gases en un tanque de polietileno grueso de 300 l de capacidad ubicado sobre la región dorsal (Fig. 5).

FIGURA 5: Medición *in vivo* de CH₄ entérico en INTA Castelar.



Método del globo



Fístula inferior.

El inconveniente se presentó en el dato final del gas debido a que existían pérdidas a través de la fístula: se probó colocar la fístula en la parte inferior del rumen y

determinar el volumen final, sin obtener resultados satisfactorios. Otra alternativa desarrollada fue la máscara facial, confeccionada de látex y se sujeta al maxilar superior por detrás de la cabeza de manera que se fije herméticamente. La misma presenta válvulas de espiración e inspiración, colectando el aire (Fig. 6). El diseño se mejoró incorporando un derivador de secreciones nasales para no interferir en el proceso de registro de las emisiones durante la respiración, no obteniendo resultados satisfactorios.

FIGURA 6: Máscara facial para colecta de gases



Método de la máscara.

Medición de volumen total.

Se avanzó con la medición por telemetría, este consta de un equipo electrónico que mide el flujo de gas producido en el rumen, evacuándolo lateralmente por la fístula ruminal a través, de un sistema de válvulas unidireccionales que impide la reentrada de gases en el rumen. El aparato contiene un dispositivo de comunicación celular que utiliza la red GPRS para enviar los datos medidos vía internet a un servidor, que almacena esta información en una base de datos para su posterior análisis. En la Figura 7 se presenta el esquema general de los componentes de medición de gases ruminales por telemetría.

FIGURA 7: Componentes del módulo de Telemetría



El módulo presenta diferentes tipos de fuentes de alimentación, dando la posibilidad de estar conectados permanentemente a la red eléctrica que cuenta con un sistema de carga y control de una batería que se utiliza como back up en caso de corte de luz, y para los equipos que sólo funcionaban a batería, se armó un pack de baterías de níquel-metal y un cargador. Para controlar el nivel de batería se agregó a la página web un casillero que indica su estado. El circuito de control es el encargado de enviar las señales de control hacia la placa de potencia y también se encarga de recibir los datos del sensor de flujo enviando, una vez digitalizados, el paquete de información al módulo de comunicación GPRS, tratándose de un modem celular que requiere una línea habilitada de modo de poder acceder a la Red GPRS para enviar los datos de las mediciones al servidor.

FIGURA 8: Medición on line de CH₄ entérico por Telemetría



Medición a campo por telemetría.



Módulo de telemetría.

Para corroborar la certeza en las mediciones se evaluó la posibilidad que pudiera haber una parte de los gases ruminales que se exhale por las vías respiratorias superiores, por lo que se estudió la evacuación de gases en bovinos con fístulas de rumen y fístulas esofágicas en simultaneo, el resultado de este estudio permitió determinar que parte de la emisión de estos gases se producía a través de la fístula de esófago, lo que se constituyó en un indicador verificable que la colecta de gases vía la fístula ruminal era parcial en la eructación. Por esta razón, se diseñó un tubo endotraqueal que debe insertarse dentro de la fosa nasal hasta la cavidad virtual, previo realización de un piercing para pasar precintos y realizar la fijación de tubo en nariz, permitiendo la captura del aire eructado y espirado.

FIGURA 9: Ubicación del tubo endotraqueal



Vista externa de ubicación traqueotubo.



Sujeción del traqueotubo a la tubuladura.

Para la realización de la tubuladura, primero se fija en el cepo de la cabeza del animal y se realiza el piercing en morro, para ello, se debe llevar cabo una preparación previa del animal que consiste en insertar una tubuladura que atraviese la zona cartilaginosa del tabique nasal, de modo tal que sirva para anclar el tubo. Previo, en función al tamaño del animal, se identifica la sonda (tubo) adecuada para posición adecuada en animal. En la experiencia, se utiliza un tubo endotraqueal de 10 mm por tratarse de bovinos de tamaño grande (aproximadamente 500 kg). Una vez introducido e insuflado el tubo, se fija con precinto al piercing. Para asegurar que el flujo de gases no retorne durante las inspiraciones, se debe incorporar al sistema una válvula unidireccional a la salida del traqueotubo. Dicha válvula debe poseer una membrana tal que ofrezca poca resistencia al flujo saliente de gases y que, a su vez, produzca un sellado perfecto para evitar el retorno. Los gases atraviesan la válvula dirigiéndose al sistema de registro que consta de dos sensores, uno de volumen y otro de concentración de metano, acoplados entre sí, y ambos al registrador (Fig. 10). Este último posee un visor en el cual pueden observarse los volúmenes acumulados de gases y las concentraciones instantáneas de metano. El aparato registrador cuenta también con un MODEM celular con tecnología GSM, al que se le debe colocar un CHIP SIM, sin restricción de compañía. El único requerimiento es que la línea tenga habilitado el paquete de datos, de modo de poder acceder a la Red GPRS para enviar los datos de las mediciones al servidor. El sistema es montado en un estuche, junto a la batería de alimentación cuya duración media de carga es de 48 horas.

FIGURA 10: Componentes del sistema de medición



Válvula unidireccional.

Membrana.

Sistema de registro.

Se adicionó al canister un recipiente plástico con solución líquida buscando relacionar la salida del líquido con la entrada del gas (Fig. 11). En la parte superior del botellón de 2.5 l de capacidad, se ubica el orificio de entrada, que se conecta a una línea de aspiración que termina en el tubo traqueal dentro de la cabeza del animal. Desde orificio inferior se conecta un sistema de manguera con aparato regulador de salida del volumen del líquido, permitiendo alcanzar el equivalente entre lo que sale de líquido y entra de gas. Primero se debe determinar una aproximación de la cantidad de gas que se producirá en el periodo determinado, para después regularizar la cantidad de salida del líquido de manera tal de llegar al final del periodo de medición con solución en el recipiente (con esto se busca evitar pérdidas de gas). Suponiendo que una gota contiene 0.05 ml de agua, entonces, por cada ml de gas entrante se deberá evacuar 20 gotas de solución. Actualmente en revisión.

FIGURA 11: Sistema de colección continúa de gases con botellón



Medición en animales pastoreando.



Componentes del sistema.

Conscientes de la importancia de la ganadería en relación a los GEI, y al no existir metodologías sencillas, fáciles de implementar y estandarizadas, la EEA San Luis está trabajando en alternativas menos invasivas que apuntan a obtener evaluaciones

in situ de parámetros gases ruminales. En este capítulo se desarrolla un sistema de medición de CH₄, NH₃, COV, H₂S, CO y CO₂ a través de una fistula ruminal.

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1 PRINCIPIO DEL FUNCIONAMIENTO

Los ensayos para calibración de la técnica se llevaron a cabo durante los periodos 2011 y 2012 en la Estación Experimental Agropecuaria San Luis. Todos los procedimientos para el manejo y uso de los animales se realizan dentro de las normas, reglamentación del Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL).

3.2.2 PREPARACIÓN ANIMALES

Se trabajó en un cepo con 6 animales Aberdeen Angus de 14 meses de edad, con peso promedio de 260 kg. Se rasuró un zona en cuyo centro se ubicaba el área quirúrgica, por debajo de la apófisis transversa de la primera vértebra lumbar izquierda, utilizando 20 ml de anestesia local (lidocaína al 2%), se infiltró en el tejido celular subcutáneo y músculos oblicuo abdominal externo e interno, luego se acostó el animal, previo ayuno de 24 horas. La zona se esterilizó con una solución de povidona-yodo. Valiéndose de un trocar de acero inoxidable de 2.5 cm de diámetro se efectuó un corte circular de la piel, los planos musculares y peritoneo. Se exterioriza parte del rumen fijándolo a la piel, con agujas no traumáticas curvas con nylon. Luego se lubrica los bordes de la herida y se introduce el cuerpo de la cánula. Al ser una estructura de polipropileno pequeña (1cm de diámetro) los cuidados pos-operatorios se limitan a aplicación de antibióticos y observación diaria del proceso de cicatrización. Quince días después de la cirugía, el animal estuvo en condiciones para iniciar los ensayos, manteniéndose otros quince días en periodo de acostumbramiento de dieta para permitir la estabilización de la flora ruminal.

FIGURA 12: Cirugía en animales de EEA San Luis



3.2.3 CARACTERÍSTICAS DE EQUIPOS

Los equipos Reike Keiki RX-415 y Eagle son instrumentos portátiles que detectan combinaciones de gases. Son equipos en los que la medición se realiza en el propio instrumento, obteniéndose la concentración del gas a partir de la lectura reflejada en el display. Los monitores están constituidos por un sensor que, en contacto con el gas a medir, genera una señal eléctrica que es registrada en un dial y se transforma en unidades de concentración del gas presente en el ambiente. Con la ayuda de una bomba de aspiración, normalmente incorporada en los monitores de lectura directa y una sonda se pueden realizar mediciones desde el exterior de lugares cerrados o de difícil acceso. El modelo RX -415 permite determinar concentraciones de O_2 , CO_2 , CH_4 y CO , a través de la combinación de sensores infrarrojo (NDIR), galvánico y de células electroquímicas, con rangos de medición entre 0 y 100% LEL (límite inferior de explosividad), o de 0 a 100% volumen (vol.) para CH_4 ; de 0 a 25% vol. para O_2 ; de 0 a 1000 ppm para CO y de 0 a 20% vol. para CO_2 . Para la determinación de otros compuestos precursores de sustancias odoríferas se recurrió a un equipo Eagle 2, que utiliza sensores fotoionizables (PID) para aplicaciones con alta sensibilidad e infrarrojos, identificando NH_3 con un rango de 0 a 75 ppm, H_2S hasta una concentración

de 100 ppm, y compuestos orgánicos volátiles (COV) con un rango de 0 a 2000 ppm. Los COV son sustancias químicas orgánicas cuya base es el carbono y se evaporan a temperatura y presión ambiental generando vapores, que pueden influir en la degradación de la capa de ozono (el Protocolo de Kyoto y de Montreal contemplan actuaciones para disminuir las emisiones de estos compuestos a la atmósfera de manera que se evite su efecto sobre el ozono estratosférico), y también como precursores del ozono troposférico generando lo que se conoce como smog fotoquímico. Además tiene la posibilidad de configurar sensores infrarrojos para CO₂, metano o isobutano para las escalas de LEL y % en volumen. Cuenta con doble filtro hidrofóbico incrementando su protección contra el agua. Ambos equipos poseen bomba interna controlada permanentemente mediante un medidor de caudal el cual detiene la misma en caso de notar reducciones en el caudal de muestreo. Opera continuamente por un lapso de 34 horas con baterías alcalinas o por 20 horas con baterías recargables de Ni-Cd, tiene controles de autocalibración, silenciar alarma, demanda cero, memoria de picos. En el procedimiento de medición el volumen de aire ingresa a la sonda conectada a una bomba de aspiración y, transcurridos 15 segundos para su estabilización, se lee la concentración en la pantalla del equipo.

A finalizar el primer periodo de ensayos (año 2012), ambos equipos fueron enviados al representante de RR en Argentina, para su mantenimiento y calibración correspondiente.

FIGURA 13: Equipos Portátil de cuantificación de gases RX-415 y Eagle.



3.2.4 PUESTA A PUNTO DE METODOLOGÍA

Para el proceso de estandarización en la determinación de gases ruminales, se ensayaron diferentes modificaciones, estipulando el siguiente protocolo: durante la

semana de medición, los bovinos se encuentran encerrados en boxes con agua *ad libitum*. Por cada tratamiento el animal se encuentra bajo una misma dieta por 25 días, en una sola entrega a las 8:00 AM. Al momento de realizarse las mediciones, los animales son llevados al cepo donde se ensambla el equipo detector de gases portátil. La porción externa de la cánula se conecta a un tubo conector, que a través de una manguera, se conecta a la sonda del aparato lector de gases. En el procedimiento de medición el volumen de aire ingresa a la sonda por acción de la bomba de aspiración y, transcurridos 15 segundos para su estabilización, se lee la concentración en la pantalla del equipo.

3.2.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La precisión del método se estima a través de la reproductibilidad, indicando el grado de concordancia de los resultados obtenidos cuando el método es aplicado a la misma muestra reiteradamente por distintos y en diferentes días. En este caso la muestra está representada por la dieta, para las cuales se eligieron 3 calidades distintas: raciones de calidad, alta (PB=14% y Dig. >65%), media (PB=9% y Dig. >55%) y baja (PB=4% y Dig. <55%), evaluada en diferentes animales fistulados, en distintos días. La validación del método se conduce de acuerdo al coeficiente de Horwitz (AOAC). Este coeficiente de variación definido por W. Horwitz, surge a través de la ecuación obtenida de un estudio estadístico, después de reunir una serie de datos, provenientes de 150 ensayos de interlaboratorios organizados por AOAC. En dicho estudio, se observó que el coeficiente de variación de los valores medios dados por los diferentes laboratorios aumentaba a medida que disminuía la concentración del analito. La ecuación de Horwitz, está definida como:

$$CVH = 2(1 - 0.5 \log(C))$$

Ecuación 6

H= Coeficiente de variación de Horwitz

C= concentración del muestra expresado en potencia de 10

El criterio de aceptabilidad para la precisión se puede hacer en base a coeficiente de variación de Horwitz, se acepta si $CV\% < 2CVH\% * 2^{-1}$. El CVH se expresa en potencia de 2, y la concentración media de la muestra expresada como potencia de 10, de esta forma independiente de la muestra y el método utilizándose puede estimar el coeficiente de variación esperado para la precisión, proponiendo la determinación de un rango aceptable para una muestra de acuerdo a su concentración.

Se analizaron los diferentes gases en función a la calidades a través de un análisis de la varianza cuya hipótesis nula es que todas las medias de las mediciones de un gas x sean iguales en las distintas calidades, y la alternativa es que al menos una sea diferente. Si se llegara a encontrar diferencia significativa, se procederá a realizar el estudio de comparaciones múltiples de Tukey. Los análisis estadísticos y gráficos se realizaron con software InfoStat versión 2015 (Di Rienzo *et al.*; 2015).

3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Durante el proceso de estandarización de la técnica se ensayaron diferentes dietas con mezclas variadas de pasturas, granos y subproductos de variadas calidades. La precisión de los resultados puede ser un indicador utilizado para validar el equipo de acuerdo a AOAC (Horwitz). En la Tabla X se observa dicho parámetro (CVH%), además de las medidas de resumen estadístico. De acuerdo a Horwitz, el coeficiente de variación para reproducibilidad es, en todos los gases medidos, menor al CV%, por lo cual se cumple el criterio de aceptabilidad establecido.

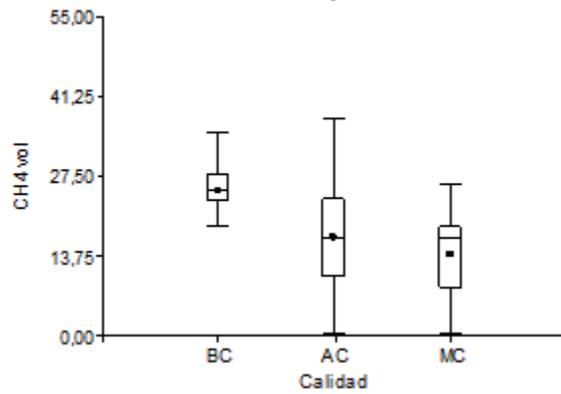
Tabla X: Estadística descriptiva de parámetros poblacional en rumen

Variable	Media	D.E.	Var(n-1)	E.E.	Mín	Máx	CV%	CVH%
CH₄ vol	19,34	9,18	84,34	0,80	0,35	58,00	47,48	9,76
O₂ vol%	4,82	5,25	27,53	0,45	0,00	20,70	108,83	7,91
CO ppm	649,39	354,80	125880,56	30,76	3,31	1000,00	54,63	16,56
CO₂ vol%	18,57	4,57	20,86	0,40	0,07	20,00	24,59	9,70
NH₃ ppm	4,84	5,17	26,76	0,45	0,00	28,00	106,8	7,92
H₂S ppm	84,27	32,32	1044,84	2,80	0,00	100,00	38,36	36,54

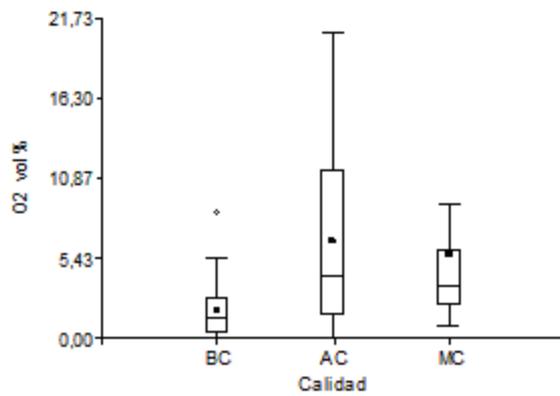
En la Figura 14 se muestran el centro, la dispersión, la simetría o asimetría y la identificación de observación es atípica de CH₄, O₂, CO, CO₂, NH₃ y H₂S.

FIGURA 14: Diagramas de cajas para CH₄, O₂, CO, CO₂, NH₃ y H₂S ruminal.

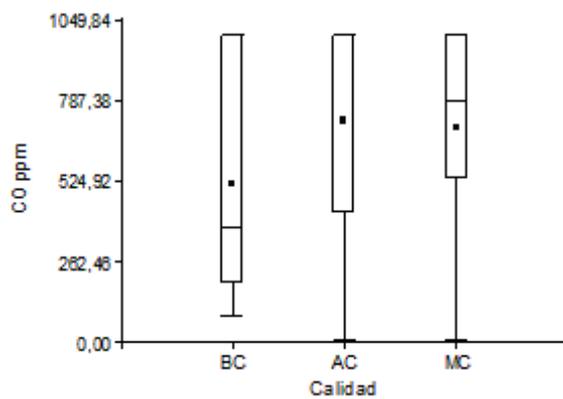
A- Media, Mínima y Máxima de CH₄ vol% ruminal



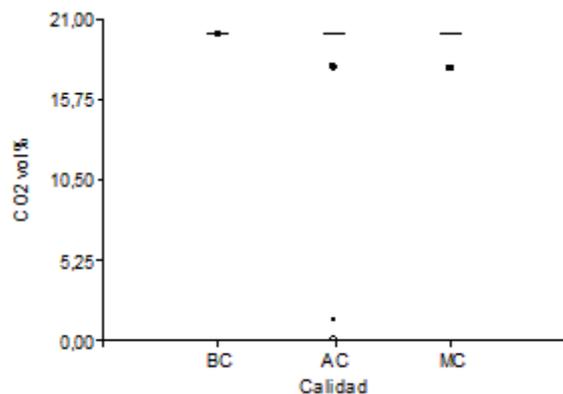
B- Media, Mínima y Máxima de O₂ vol% ruminal



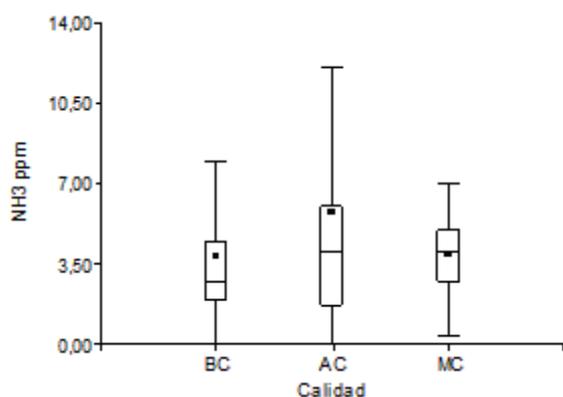
C- Media, Mínima y Máxima de CO ppm ruminal



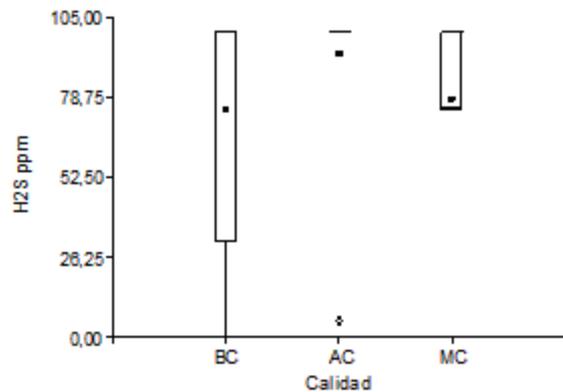
D- Media, Mínima y Máxima de CO₂ vol% ruminal



E- Media, Mínima y Máxima de NH₃ ppm ruminal



F- Media, Mínima y Máxima de H₂S ppm ruminal



Analizando los diagramas se observa gran variabilidad entre los gases ruminales, como entre las calidades de dieta de cada gas. Al comparar la generación de CH₄ ruminal entre las raciones se observa la mayor emisión para baja calidad (BC), le sigue alta calidad (AC) y por último mediana calidad (MC). También se observa la mayor variabilidad en las emisiones para alta calidad, seguido MC y por último BC. Se nota la existencia de un valor atípico en la distribución de AC, sin embargo es la más

simétrica, a diferencia de MC con asimetría por izquierda, lo que me indica que entre el 25 y 50 % de las mediciones fueron más dispersa que entre el 50 y 75%, BC asimetría por derecha, por lo que la mayor dispersión se obtuvo con los mayores valores. En el caso del O₂, la diferencia al CH₄, es que el valor medio de todas las mediciones es una tendencia hacia los mayores valores de O₂. La menor dispersión se determina con el CO₂, lo que indicaría que no se vería afectado por la dieta y para el caso de H₂S nos muestra alta dispersión en baja calidad y no así en alta. Para el NH₃ la variabilidad en la parte central de la distribución de las emisiones tanto de AC, MC y BC es muy similar. Cuando se analiza los componentes de la dieta, coincidiría con lo representado en la caja de H₂S, debido a que el componente principal de las dietas de AC es el gluten feed de maíz, con diferentes participación en las de BC, acompañado de alimentos toscos. Considerando a la calidad de las raciones como tratamiento de cada gas se observa que el único gas que no presenta diferencia significativa con la dieta es el CO₂ y NH₃ (Tabla XI).

Tabla XI: Estadística descriptiva de gases ruminales con raciones de alta, media y baja calidades.

Variable	Calidad	N	Medias	D.E.	Medianas	rangos	p-valor
CH ₄ vol%	AC	70	16,93	9,85	17,00	54,28	A
	BC	46	24,99	4,63	25,00	94,93	B
	MC	17	14,00	8,33	17,00	43,79	A
O ₂ vol%	AC	70	6,56	5,91	4,25	78,67	B
	BC	46	1,89	2,11	1,40	44,47	A
	MC	17	5,60	5,02	3,60	79,91	B
CO ppm	AC	70	723,37	331,62	1000,00	75,36	B
	BC	46	519,61	366,17	371,50	53,43	A
	MC	17	695,99	335,40	790,33	69,26	B
CO ₂ vol%	AC	69	17,82	5,47	20,00	63,45	A
	BC	46	20,00	0,00	20,00	73,00	A
	MC	17	17,68	5,98	20,00	61,29	A
NH ₃ ppm	AC	70	5,76	6,07	4,00	71,64	A

	BC	46	3,80	4,17	2,75	58,97	A	
	MC	17	3,89	2,35	4,00	69,65	A	
	AC	70	92,56	23,65	100,00	74,21	A	
H₂S ppm	BC	46	74,07	38,14	100,00	57,87	B	0,0079
	MC	17	77,77	38,38	100,00	62,03	AB	

A través de indicadores se busca evaluar los cambios en el momento de los distintos patrones de fermentación que verdaderamente producen el alimento en el animal.

3.4. CONCLUSIÓN

Conscientes de la gran cantidad de factores que afectan la producción de metano, y por defecto, la amplia gama de circunstancias para cuantificarla, es lo que determina la existencia de varias metodologías, tanto para estimarla como medirla. La revisión bibliográfica, y compilación del desarrollo de las técnicas del grupo de GEI del Instituto de Patobiología del CICVyA en INTA Castelar, evoluciona en metodologías. Por su parte en la EEA San Luis se ha interesado en la temática y trabaja en el desarrollo de una técnica *in vivo*, que permite a través de la lectura directa, la cuantificación de la concentración de gases ruminales. Entre las ventajas se destaca la rapidez en las determinaciones, económica y la certeza del muestreo puntual en el ambiente de interés de estudio (rumen). Por contrapartida, la menor precisión y posibilidad de problemas de interferencias. Además, esta metodología, no intrusiva permitiría el recupero del animal, importante para determinar los cambios bioquímicos instantáneamente a campo, permitiendo el desarrollado del diagnóstico preventivo de las enfermedades ruminales y metabólicas de los bovinos trabajo. Los resultados preliminares apuntan a la factibilidad de su aplicación en las mediciones de emisiones de metano entérico y otros gases ruminales, permitiendo disponer de la información necesaria de cada dieta específica para proponer estrategias de reducción, y que al mismo tiempo, les permita el desarrollo sustentable del sistema productivo. La técnica fue sometida a evaluaciones de pares a través de la presentación en congresos obteniendo interesantes aportes.

Capítulo 4:

MÉTODO *in vitro* DE FERMENTACIÓN RUMINAL: ANKOM RF

4.1 INTRODUCCIÓN

La necesidad de eficientizar sistemas de producción sustentables, hizo que se alcanzara un gran avance del estudio de los atributos de los alimentos (nutrientes) en las últimas décadas. Desde el '80 se decía que, para conocer la disponibilidad para los rumiantes de ciertos nutrientes en los alimentos, se requerían procedimientos analíticos apropiados que relacionaran correctamente las propiedades químicas del alimento con su verdadero valor productivo (López, 2008). En los últimos años se ha avanzado sobre procedimientos químicos, espectrofotómetro y biológicos, tanto en laboratorio como a campo. Entre los métodos *in vitro*, la técnica de producción de gases es considerada con mayores ventajas para valorar la calidad de alimentos en rumiantes (Dijkstra *et al.*, 2005), debido a que permite estudiar la cinética del proceso fermentativo. Además, es de baja demanda de mano de obra y posee menor costo por unidad de muestra evaluada de manera sencilla y rápida que metodologías *in vivo*. Cuando un alimento es incubado con líquido ruminal tamponado, los microorganismos convierten los carbohidratos y en menor medida las proteínas de los alimentos en productos finales, como son los ácidos grasos volátiles (AGV), proteína microbiana, metano (CH₄) y gas carbónico (CO/CO₂) (Snigh *et al.*; 2011). Los ácidos grasos de cadenas cortas, son también productos finales de la fermentación que se da principalmente en el rumen, siendo absorbidos y usado como fuente de energía para el animal, diferenciándose del CH₄ y CO₂ que son eliminados por eructación. Numerosas poblaciones de microorganismos están involucradas en los procesos de producción de H₂ y CO₂, las cuales constituyen el sustrato para bacterias metanogénicas. Las emisiones de CH₄ son una significativa pérdida de energía de la dieta, la cual podría ser re direccionada para la producción de leche y carne (Eckard *et al.*, 2010), y disminuir el impacto negativo al medio ambiente. La técnica de producción de gases data de la década del '70, desde que Menke y Ehrenvard (1974) midieron el desplazamiento del émbolo de una jeringa de vidrio (100 ml). Luego en 1994, Theodorou junto a su grupo de investigación, describieron una técnica simple y con mayor precisión para medir pequeños incrementos del volumen de gas. Ellos emplearon frascos de 125 ml cerrados herméticamente, generando una

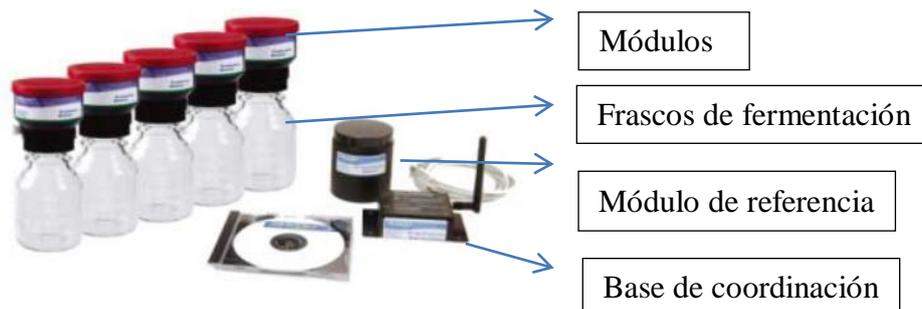
acumulación de gases en la parte superior, donde se colocó un transductor de presión permitiendo obtener el volumen de gas generado a medida que avanza la fermentación. Actualmente, hay dos formas de medir la fermentación microbiana de los alimentos a partir del volumen de gas producido *in vitro*, midiendo el volumen de gas producido, o estimarlo a partir de los cambios de presión que tienen lugar en recipientes de volumen fijo. Entre los que miden la presión se incluyen el método desarrollado por Theodorou, los métodos automatizados y computarizados de Pell, Schofield y de Cone. (Noguera *et al.*, 2006). Después de la inoculación, se igualan las presiones internas de las botellas, y los controles se realizan con un transductor de presión mediante punción a través del tapón. La sonda del transductor y la aguja están conectadas por una válvula en T, que tras cada pinchazo permite la salida del gas para eliminar el efecto de una presión acumulada en sucesivas lecturas. Para efectuar las correcciones necesarias, la presión se relaciona con el volumen de gas extraído. Por su simplicidad, estos sistemas permiten la valoración simultánea de un amplio número de muestras. No obstante, la proporción de inóculo ruminal en la mezcla de incubación (5%) es más baja que con los otros sistemas. Esto puede afectar el ritmo y la tasa de fermentación, aunque Pell y Schofield (1993), no observaron diferencias en la producción de gas total cuando emplearon bajas y altas concentraciones de inóculo. El sistema desarrollado en la Universidad de Cornell bajo el mismo principio se caracteriza porque cada botella de incubación dispone de su propia sonda electrónica para determinar la presión, al estar todas conectadas a una computadora que procede periódicamente a la lectura y registro automático de los resultados. Un inconveniente importante de este sistema es que permite la acumulación de gas según transcurre la incubación, lo que puede limitar el desarrollo de la fermentación y llevar a errores acumulados en lecturas sucesivas.

4.1.2 SISTEMA DE LA PRODUCCIÓN DE GAS ANKOM RF

El Sistema de la Producción de Gas, ANKOMRF proporciona un método fácil de usar para monitorizar y medir los gases producido por fermentación en el interior de los frascos. Este novedoso equipo que aparece en el mercado, que permitiría monitorear y medir las cinéticas del metabolismo microbiano de forma automatizada. Mediante el control de la presión del gas a través de sensores de la presión, se comunica la información a un ordenador mediante radiofrecuencia (RF). En cada unidad de fermentación (frascos) se encuentra una válvula electrónica que libera el gas acumulado al alcanzar una presión determinada, y se cierra tras alcanzar la presión atmosférica.

Esta presión se asocia a un volumen de gas específico, que registra a una en una computadora el momento y número de aperturas de estas válvulas logrando un gran número de lecturas. Sin embargo, tiene como desventaja la no estandarización de la metodología, variabilidad en los resultados y fallas en la señal de radiofrecuencia (razón por la cual se estuvo trabajando con la asistencia de Ankom en ajustar la misma).

FIGURA 15: Componentes del Sistema Ankom RF



Los gases se producen directamente como consecuencia de la fermentación del alimento, y también de forma indirecta a través de la neutralización de los ácidos con el bicarbonato del buffer, proceso en el cual se libera CO_2 . Varios autores (Getachew, 1998, 2005; Wolin, 1997; Hungate, 1966, Groot *et al.*, 1996; Schofield *et al.*, 1994; y van Soest, 1994), coinciden en que el mayor volumen se produce cuando el sustrato es fermentado generando los ácidos acético y butírico como productos finales, y en mucha menor medida, la producción de ácido propiónico, ya que este no genera CO_2 de manera directa. Al aplicarse las leyes de la estequiometría que permite el cálculo teórico de las cantidades producidas en el equilibrio de AGV, H_2 y CO_2 (van Soest, 1994), se producen cambios en las curvas de fermentación. De la complejidad de la estequiometría de las diferentes reacciones que ocurren en la fermentación, los tipos de sustratos y las condiciones experimentales, existen diferentes sistemas de medición y modelos matemáticos, para ajustar los perfiles de producción de gases (France *et al.*, 1993; Shofield *et al.*, 1994; Groot *et al.*, 1996) en constante investigación y mejoras. El objetivo de este capítulo es la evaluación del equipo de Ankom RF en cuanto al papel que desempeñan en la descripción de la cinética de producción de gas y determinar criterios de selección estadísticos que permiten elegir el mejor ajuste.

4.2 MATERIALES Y MÉTODOS

El ensayo se realizó en INTA, EEA San Luis (Latitud 33°39'50" S, Longitud 65°24'37" W). Se siguió la metodología de Theodorou y otros (1994) indicada en el Manual operativo del equipo Ankom RF- Rev. D 8/31/10 (www.ankom.com). El sustrato de incubación fue alfalfa (*Medicago sativa*), cosechada con 30 días de rebrote, y en una segunda etapa en simultáneo con pasto llorón (*Eragrostis curvula*). Ambas se secaron a 65°C por 48 h, continuando con un molido y tamizado (2mm), para posterior determinación analítica de materia seca (AOAC, 1990), proteína bruta por Kjeldahl, en forma secuencial, fibra detergente neutra (FDN), fibra detergente ácida (FDA) y lignina detergente ácida (LDA) (Goering y Van Soest, 1970). Se introdujo 1g de MS de muestra (+/- 0.005) dentro de frascos de vidrio de 250 ml. Se inoculó con 20 ml de fluido ruminal extraído previamente (15 minutos) de animales fistulados (bovino macho de raza Aberdeen Angus con fístula en rumen, de peso vivo 350 kg) alimentados a base de heno de alfalfa de buena calidad (10% de floración).

4.2.1. OBTENCIÓN DE INÓCULO

El inóculo se extrajo directamente a través de la fístula ruminal (Fig. 16), se tomó un puñado de mezcla del rumen, se exprimió el contenido para extraer el líquido y éste se almacenó en termos previamente calentados con agua a 40°C para su transporte.

4.2.2. TRATAMIENTOS EN LABORATORIO

En el laboratorio el material ruminal se licuó por 30 segundos, se filtró y transfirió a un erlenmeyer mantenido en baño maría a 39°C, continuamente saturado con CO₂. Muestras e inóculos se mezclaron con buffer en relación 1:4 v/v, en constante burbujeo de CO₂. La solución tampón utilizada fue la propuesta por Kansas State (Marteny Barnes, 1980) compuestas por minerales, fuentes de nitrógeno y agentes reductores que ayudan a la anaerobiosis necesaria en el proceso (Tabla XII).

FIGURA 16: Extracción de inóculo



Tabla XII: Composición solución buffer Kansas State

SOLUCIÓN A		G/L
KH_2PO_4		10.0
$\text{MGSO}_4 * 7 \text{H}_2\text{O}$		0.5
NACL		0.5
$\text{CACl}_2 * 2 \text{H}_2\text{O}$		0.1
UREA		0.5
SOLUCIÓN B		G/L
NA_2CO_3		15.0
$\text{NA}_2\text{S} * 9 \text{H}_2\text{O}$		1.0

SE MEZCLA 20 ML DE SOLUCIÓN B CON 1000 ML DE A, AJUSTANDO EL PH A 6.8

A cada vaso de 250 ml, se le adiciona 25 ml de de inóculo ruminal, 100 ml de solución buffer y 1 gramo en MS de alfalfa (para tratamiento 1), o pasto llorón (tratamiento 2). Luego son colocados en un baño termostático a 39°C, y se incorpora un vaso fermentador como blanco que contenía solución inóculo y buffer, sin muestra (Fig. 17). Una vez estabilizada la temperatura se comienzan con las lecturas de presión cada 5 minuto por 25 h, corregidas con la presión que indica el módulo cero (14 psi), fijando una apertura de la válvula a 5 psi de presión interna. Se realizaron 3 corridas con 2 repeticiones por tanda.

FIGURA 17: Acondicionamiento de Inóculo en laboratorio



4.2.3. PRESION DE GAS

La presión de gas medida durante el estudio se convirtió en moles de gas usando la ley de los gases ideales y aplicando la ley de Avogadro se transforma los moles en ml de gas. Ley de gas ideal (Ec.7) y Ley de Avogadro (Ec. 8).

$$n = p * v(RT)^{-1}$$

Ecuación 7

n: gas producido en moles (mol)

p: presión en kilopascal (KPal)

V: volumen de gas libre en el microfermentador (L)

T: temperatura en kelvin (K)

R: constante de los gases reales (8.314472 l*Kpa/K*mol)

$$gas = n * 22.4l mol^{-1} * 1000ml * mol^{-1}$$

Ecuación 8

n= N° moles (mol)

En la conversión de unidades se consideró 1psi=6.894757293; 1k=273°C y un mol de gas ocupa 22.4l a 0°C, utilizando 25.6 l*mol⁻¹ que corresponde al volumen que ocupa un mol a 39°C.

4.2.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los modelos utilizados para el ajuste de las curvas de producción de gas fueron polinomial cúbica, logístico, Gompertz y monomolecular. El modelo polinomial supone que la tasa de producción de gas depende únicamente del sustrato disponible una vez alcanzado el tiempo de colonización, no así los otros tres que consideran la producción de gas proporcional al tamaño de la población microbiana y al sustrato digestible. Los

modelos se compararon sobre la base de herramientas estadísticas como el Cuadrado Medio de Error (CME) y los criterios de información de Akaike (AIC) y Bayesiano (BIC). La selección de estos parámetros se basa en que el CME agrupa la variabilidad de aquellos factores que no tiene en cuenta el investigador, el AIC considera la diferencia en el número de parámetros entre los modelos, y el BIC incorpora además, los cambios en la bondad de ajuste y el número total de datos. El análisis se realiza con el software estadístico de Infostat V2015.

Para contrastar si las diferencias de presiones obtenidas al comparar los dos tratamientos (alfalfa vs pasto llorón) permite la evaluación de la hipótesis, se aplicó la prueba t-Student para dos muestras independientes. Se puede expresar matemáticamente el modelo estadístico (Ec. 9)

$$X_{ij} = t_j + e_{ij}$$

Ecuación 9

t = Efecto de la dieta sobre la producción de gas, entonces t_j supone que actúa uniformemente sobre la variación de la presión, es decir que, a un mismo tratamiento (misma dieta) se producirá el mismo volumen de gas.

e_{ij} = Varia de unidad experimental a unidad experimental, y además refleja todo tipo de variabilidad que no ha sido investigado por el investigador, este término es denominado error experimental.

En los contrastes para muestras independientes la hipótesis nula (H_0) propone que las medias de las dos poblaciones son iguales y se establece la hipótesis alternativa (H_1) de que son diferentes.

4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla XIII se muestra la composición química de material muestra.

Al analizar las curvas de respuesta para los factores de tratamiento, se observa que el factor cuantitativo puede tener varios niveles de graduación. Los perfiles de la producción de gas obtenidos corresponden a diferentes tiempos de incubación (cada cinco minutos hasta 25 h) usando el equipo de Ankom RF. La presión originada por los gases acumulados en la parte superior de los frascos son transferidos por el sensor a la computadora, generando una base de datos de $n=2092$ por corrida para estimar los parámetro de degradación.

Tabla XIII: Parámetros sobre calidad nutricional de alfalfa y pasto llorón.

Muestra	C. física	MS %	FDN %	FDA %	PB %	DIVMS %	EM Mcal/kgMS
Alfalfa (<i>M. sativa</i> L.)	Heno	94,98	49,72	30,10	17	76.80	2.35
P. Llorón (<i>E.cúrvula</i>)	Diferido	70	60	41.6	4.7	47.59	1.72

MS: Materia Seca. PB: Proteína Bruta. FDN: Fibra Detergente Neutro. FDA: Fibra Detergente Ácida. LDA: Lignina detergente Acido. DIVMS: Digestibilidad *in vitro* de la MS. EM: Energía Metabólica

La aplicación de los modelo de regresión no lineal determinó que el modelo monomolecular fue el que explicó mejor la cinética de la producción de gas, presentando el menor CME y BIC en todas las corridas en base a el sustrato alfalfa. Las curvas obtenidas en función al tiempo de degradación observada y estimada, presentaron forma sigmoideal distinguiéndose una fase inicial de lenta producción de gas, exponencial lo que indica una rápida producción y asintótica mostrando casi nula actividad. La tendencia de curva explicaría el menor ajuste del modelo lineal, determinando los modelos no lineales un adecuado ajuste en las primeras horas del proceso fermentativo y durante fase exponencial, no así en la fase asintótica debido a la histología del tejido del sustrato que varía con el avance fenológico aumentando el tejido vascular lignificado el cual es indigestible, determinando distintas tasas de degradación y volumen de gas producido, siendo este comportamiento complejo de predecir con un modelo matemático.

Tabla XIV: Descripción matemática y parámetros estadísticos de los modelos evaluados

	Ecuación	α	β	γ	CME	AIC	BIC
Cúbica	$\beta + \beta_1 t + \beta_2 t^2 + \beta_3 t^3$		126.38 21.25 33.6 ⁻² 43.6 ⁻⁶		331.23	18038	18066
Logístico	$\alpha / (1 + \beta e^{-\gamma t})$	140.47	4.08	0.03	315.62	17937	17959
Gompertz	$\alpha e^{(-\beta e^{-\gamma t})}$	141.14	1.93	0.02	309.7	17897	17920
Monomolecular	$\alpha (1 - \beta e^{(-\gamma t)})$	142.40	0.96	0.02	306	17887	17901

α =volumen de gas correspondiente a la completa digestión del sustrato (asíntota)
 β = tasa constante de producción de gas del material potencialmente degradable (intercepta)
 γ =factor constate de eficiencia microbiana (asociado a la pendiente)

Los atributos de la degradación de dos alimentos característicos en la dieta base de los sistemas intensivo (alfalfa) y extensivos (pasto llorón) de la zona, estimados a

partir de la aplicación del modelo monomolecular y el análisis estadístico de los datos, se presentan en Tabla XV.

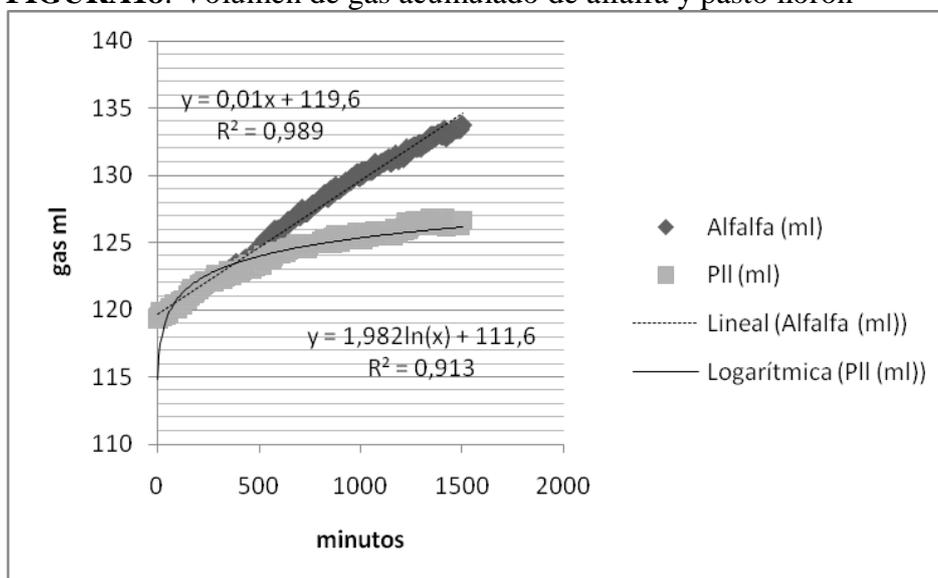
Tabla XV: Coeficientes del modelo Monomolecular y estadísticos asociados

Variable	Parámet.	Estimac	EE	LI	LS	ED	N	T	*p-valor
P. llorón <i>E. cúrcula</i> ml/gMS	Media	49,60	1,10	47,40	51,64				
	Mediana	55,19	1,24	51,30	56,71	19,43	301	44,3	<0,001
	Varianza	374,85	30,08	316,25	435,26				A
	Monomol.	$\alpha=75.82, \beta=0.001, \gamma=0.001$							
Alfalfa <i>M. sativa</i> ml/gMS	Media	78,93	2,31	74,38	83,10				
	Mediana	83,18	4,64	73,55	92,07	42,88	301	31,9	<0,001
	Varianza	1837,43	100,03	1626	2024,4				B
	Monomol.	$\alpha=147.01, \beta=0.001, \gamma=0.001$							

*Prueba de Friedman, T2 282,02. Letras diferente indican diferencias significativas (p > 0,05)

En la Figura 18 se representan las producciones de gas observada tras 25 h de incubación de los forrajes de alfalfa y pasto llorón. La producción media de la alfalfa (133.84mlgas*g MS⁻¹) fue significativamente mayor al pasto llorón (126.62 ml gas*g MS⁻¹; P<0,05).

FIGURA18: Volumen de gas acumulado de alfalfa y pasto llorón



Nuestros resultados fueron bajos en volumen de gas en alfalfa al compararlos con resultados obtenidos en el estudio de la técnica Menke y Steingass realizado por Getachew *et al.* (2004), abarcando un rango de 185 ml hasta 235 ml*gMS⁻¹ de heno de alfalfa, pero similar al reportado por Palladino y otros (2005) en el trabajo sobre la

producción de gas de alfalfa fresca bajo distintas condiciones de acidez ruminal utilizando donantes alimentadas con monensina, determinando producciones desde 96.9 a 131.3 ml*gMS⁻¹. No se encontraron datos de volúmenes publicados por otros en pasto llorón. En general, al comparar los valores de gas obtenidos en relación a su composición química, se determina una alta correlación, la menor producción de gas en pasto llorón está ligada al mayor contenido en FDA que presenta dicho forraje. Los menores volumen obtenidos en el ensayo puede deberse a varios factores, como la escasez de nutrientes para los microorganismos debido al tiempo de fermentación transcurrido y pequeño volumen del sistema en el equipo de Ankom, acumulación de productos finales en la fase líquida que saturan el medio produciendo el descenso de pH y cantidad y características del alimento. La alfalfa es un alimento alto en PB, para el cual se debe hacer un análisis diferencial, en el caso de la caseína, por ejemplo, produce por fermentación solo el 32% de la cantidad que los carbohidratos. La degradación de proteína genera aa y péptidos, que principalmente pasarían a integrar la biomasa microbiana, y como segunda opción integrar los productos finales de la fermentación (AGV, CO₂, CH₄ y NH₃), generando gas que podría cuantificarse, sólo en este segundo caso. Esto se debería a la relación inversa entre la producción de gas y la síntesis de masa microbiana, utilizando esta energía afectando el valor del alimento (Fondevila y Barrios, 2001). Cone y Gelder (1999) estimaron que el incremento de un punto porcentual de PB reduce la producción de gas en 2.48 ml por gramo de materia orgánica. Además, la cantidad de sustrato en fluidos ruminales es mucho menor en sistemas *in vitro* que *in situ*, y ambas que *in vivo*, lo cual puede generar una reducción en la actividad de MO determinando un valor erróneo en las mediciones. Por otra parte, la técnica de gas es más eficiente que el método *in situ* para evaluar sustancias anti nutritivas, ya que estas sustancias pueden liberarse en rumen a través de los poros de las bolsas, pero no contribuyen a la fermentación en rumen. La medición de gas provee información de las fracciones solubles e insolubles de los alimentos, y no así las gravimétricas. El monitoreo constante debido al sistema telemétrico, como la apertura de válvula para liberan la presión interna, son una de las principales ventajas, siendo una considerable limitante, la imposibilidad de simular la absorción de AGV modificando considerablemente el medio interno de los vasos fermentadores. Por otro lado, los resultados obtenidos permitieron el análisis a través de varios modelos estadísticos, de primer, segundo y tercer orden, como no lineales. La dificultad se generó para la interpretación de estos parámetros en el uso de comparación de alimentos, que

presentan diferentes tipos de tejidos con diferente composición y tasa de degradación. La diferencia en la producción de gas entre el pasto llorón y alfalfa, evidencia en las primeras horas la fermentación de compuestos solubles, y luego, más lentamente la utilización de CH estructurales, debido a que material debe hidratarse y posteriormente ser colonizado por los MO ruminales, lo que origina diferentes tasa de degradación, por ende diferentes curvas. El menor volumen generado por el pasto llorón depende de la mayor concentración de carbohidratos estructurales (FDN), contenido de lignina (FDA) y avanzado estado de madurez, mostrando un aceptable comportamiento para evaluar los perfiles de producción de gas de los distintos alimentos. En síntesis, la complejidad y el alto costo de las técnicas involucradas en las experimentaciones con animales *in vivo*, generan un atractivo para la elección de la técnica *in vitro* Ankom RF, con un alto potencial para el screening tamizado de un gran número de alimentos, aditivos, mezclas y otros compuestos convencionales o no, para evaluar el valor nutritivo, como así también, facilita la toma de decisión por el investigador en la elección de material para la posterior evaluación con animales *in vivo*.

4.4 CONCLUSIÓN

Un gran número de metodologías y modelos matemáticos para la técnicas *in vitro* han sido desarrollados con el objeto de facilitar la interpretación de los resultados experimentales. A pesar de las sucesivas modificaciones y avances, la validez de la técnica de producción de gases y potencialidad para descartar otras técnicas es cuestionada, ya que por sí sola no permite cuantificar la magnitud total de la fermentación. Los perfiles de la producción de gas obtenidos en este trabajo, corresponden a alimentos básicos en la dieta del rumiante de sistemas de invernada (alfalfa) y sistema de cría (pasto llorón) característico de la zona. En vista de que la técnica permite estudiar la interacción entre diferentes alimentos, ella puede ser empleada para evaluar como la inclusión de suplementos energéticos y proteicos, y mejorar las características de degradación de la dieta básica, y mejor respuesta animal.

Capítulo 5:
RELACIÓN ENTRE DIETA Y PRODUCCIÓN DE GASES
ENTERICOS

5.1 INTRODUCCIÓN

Desde los inicios de zootecnia el impacto de la calidad de la dieta en el metabolismo animal, y la consecuente producción de gases, es uno de los temas más estudiados y controvertidos. Tanto la estructura como cantidad de carbohidratos almacenado en los alimentos determinan la disponibilidad para las bacterias ruminales, la cual es condicionada por la tasa de fermentación y velocidad de pasaje del alimento (Hall *et al.*, 1998). Así también, la disponibilidad de carbohidratos determina la tasa de crecimiento microbial y eficiencia de utilización de amonio en rumen (Isaacson *et al.*, 1975; Strobel y Russel, 1996; Newbold y Rust, 1992; Hristov *et al.*, 1998). Cuando existe una limitante de energía, tanto los MO que degradan proteínas a amonio, como el consumo, se ven deprimidos. También existe una relación entre la energía y producción de gases entéricos. Sutton y otros (2003), mostraron la correlación directa entre la concentración de propionato y la glucogénesis con el aumento de concentrados en la dieta, no coincidiendo Dewhurst y col. (2006). En su trabajo, Dewhurst encontró una relación lineal existente entre los AGV y butirato, a expensas del acetato, pero no afectó al propionato cuando se incrementó la concentración energética en la dieta, evidenciando ello, cómo la calidad y cantidad del alimento en los bovinos afectan la producción de gases en rumen. El consumo de alimento está positivamente relacionado con el tamaño del animal, la tasa de crecimiento y el nivel de producción. El contenido de materia seca y la calidad del forraje influyen en los procesos fermentativos, generando gases que son exhalados por respiración y la eructación. Los gases eliminados por procesos de eructación son principalmente CO₂ y CH₄, sin embargo, el origen mayoritario del CO₂ es respiratorio, a diferencia de CH₄ que corresponde a los procesos que acontecen en el sector gástrico anterior. Además se generan en el proceso fermentativo otros gases como el NH₃ y H₂S, en exceso pueden causar desordenes metabólicos. Por otro lado, el estudio de van Zijderveld y otros (2011) muestra las interacciones múltiples que se dan en el rumen indicando que el suministro de suficiente nitratos (NO₃⁻) en la dieta dejaría el H₂ disuelto fuera del proceso de metanogénesis, por

la reducción de nitratos a NH_3 , con lo que también se disminuiría la eliminación de N_2 por orina. Sin embargo, la dosis de NO_3^- efectiva podría ser un factor de complicación, por la transformación a nitritos (NO_2^-), compuesto altamente tóxico para el rumiante.

5.1.2 DIETA Y METANO EN BOVINOS

Existe amplia bibliografía vinculando el alimento y la tasa de emisión de metano condicionado por las características físicas y químicas del alimento (Blaxter y Clapperton, 1965; Aguilera y Prieto, 1991; Johnson y Johnson, 1995; Moss *et al.*, 1995; Mills *et al.*, 2003). La producción de CH_4 crece con la cantidad ingerida de alimento, no obstante, la tasa de producción por kilo de alimento consumido puede disminuir al aumentar la calidad de la alimentación. Esta disminución se debe principalmente a que al aumentar la ingestión de materia seca se acelera el paso del alimento por el aparato digestivo, reduciéndose el tiempo para realizar la fermentación ruminal (Hindrichsen *et al.*, 2006). Johnson y Jonson (1995) indican dos principales factores responsables de las variaciones en la producción de metano: cantidad de carbohidratos fermentados en el retículo-rumen, lo cual implica diversas interacciones dieta-animal, que afectan el balance entre las tasas de fermentación de estos carbohidratos y la tasa de pasaje, y el otro, la relación de ácidos grasos volátiles (AGV) producidos, la cual regula la producción de hidrógeno y la subsecuente producción de metano. Las pérdidas energéticas en la producción de metano por los rumiantes significan entre un 2 y un 12 % de la energía bruta incorporada en su alimento, pero cuando la alimentación es con forrajes de baja calidad nutritiva, la producción de metano puede representar entre el 15 y el 18% de la energía digestible (Montenegro y Abarca, 2000). En las dietas de alto nivel en concentrado (superior al 80%) que superen los requerimientos de mantenimiento, las pérdidas de CH_4 se encuentran por debajo del 5%. La alta tasa de digestión inducen una baja al pH, creando condiciones desfavorables para la flora microbiana metanogénica y las poblaciones de protozoos ruminales, que se manifiestan en una mayor concentración relativa de ácido propiónico (Johnson *et al.*, 2002). Rumiantes alimentados con heno de baja calidad pueden generar dos kilos de metano por cada kilo de carne ($\text{kg CH}_4 \cdot \text{kg carne}^{-1}$), por el contrario, con suplementación nutricional, la producción de metano puede disminuirse hasta $0,36 \text{kg CH}_4 \cdot \text{kg de carne}^{-1}$ (Preston y Leng, 1989), siendo la proporción de energía digestible que es fermentada a metano del 8% para la dieta suplementada y la sin suplemento alcanza el 15%. Kurihara

y otros (1999) observaron que la relación entre ganancia de peso y producción de metano es de tipo curvilíneo, apuntando que con dietas que faciliten la ganancia de peso por parte del animal, la producción de metano es menor (Fig. 19), y para el consumo de materia seca, la relación es lineal respecto a la producción de metano (Fig. 20)

FIGURA 19: Relación entre ganancia de peso y producción de metano en rumiantes

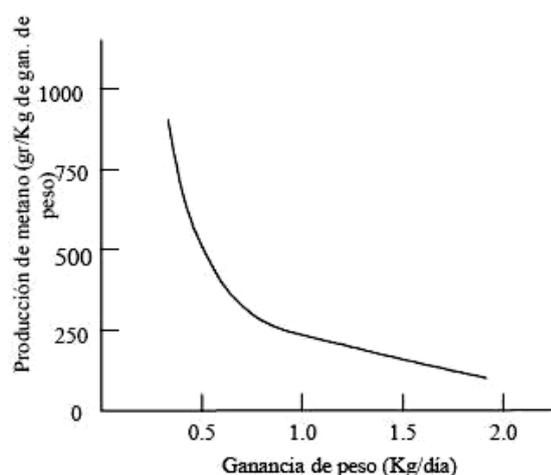
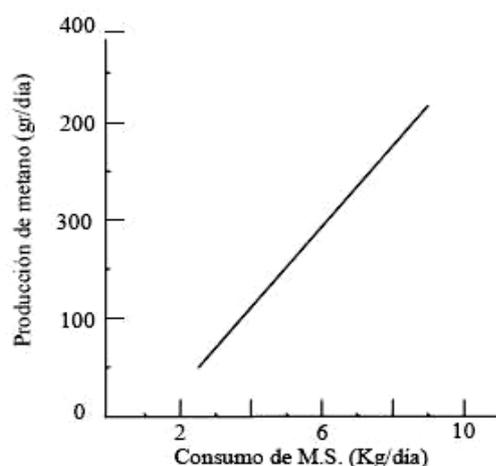


FIGURA 20: Relación consumo de MS y producción de metano.



El análisis realizado por el grupo de investigación de Yan (2006) en base a información del Instituto de Investigación de Agricultura de Irlanda del Norte, sobre dietas de silajes para tambo, muestra la correlación entre emisión de metano (CH_4), peso del animal (PV), consumo de materia seca digestible (CMS), producción de leche (PL) y nivel de alimentación (NA). La relación $\text{CH}_4 \cdot \text{CMS}^{-1}$ y $\text{CH}_4 \cdot \text{PL}^{-1}$ se incrementó con

el mayor valor de los componentes fibrosos (>FDN y >FDA), y no así con el mayor valor de PB y concentración energética, concluyendo que la aplicación de tecnologías para la obtención de silajes de maíz con elevado porcentaje en granos, sería una alternativa para disminuir la producción de metano. Por su parte, las leguminosas, en general, debido a la composición química de los carbohidratos de la pared celular y del contenido de carbohidratos fácilmente fermentables, afectan la emisión del metano y la inclusión de estas especies en la dieta de bovinos es una estrategia práctica de disminución (Hindrichsen *et al.*, 2006). Los lípidos también interactúan con los diferentes microorganismos ruminales afectando la generación de gases entéricos, siendo más bioactivos los ácidos grasos saturados de cadena media y los insaturados contra microorganismos metanógenos y protozoos, presentando como desventaja la escasa palatabilidad, por lo tanto un bajo consumo de este tipo de alimento (Lee *et al.*, 2011). Los ácidos grasos poliinsaturados disminuyen las bacterias celulíticas pero incrementan la actividad proteolítica (Yang *et al.*, 2009). Los aceites esenciales inhiben bacterias proteolíticas *archaea* metanogénicas (Eschenlauer, 2002).

5.1.2.1 ALMIDÓN

La tendencia a nivel mundial en dietas bovinas son a base de granos de maíz, sin embargo su uso actual se cuestiona por competir directamente con el consumo humano (Garnett, 2009). Los argumentos para su utilización se basan en la mayor producción de carne, necesaria para alimentar a la población mundial que está en continuo crecimiento, como también el consumo de proteína animal, y en las pruebas científicas que convergen en la aseveración que se genera menor emisión de gas metano con dietas concentradas en maíz por unidad de producto al compararlo con dietas forrajeras (Johnson y Johnson, 1995). Esto se debe a que el principal componente de grano de maíz es almidón, precursor del ácido propiónico siendo una alternativa de fuente de hidrógeno, que compite con la metanogénesis. Además, genera la caída del pH lo que conlleva a la muerte de la población de protozoos, limitando la transferencia de H₂ hacia los organismos metanogénicos (Willian y Coleman, 1988). Debido a que el almidón es clave para la obtención de altas ganancias de peso, el grupo de investigación de Producción Animal de la EEA San Luis, conjuntamente con alumnos de ingeniería agronómica de la Facultad de Ingeniería y Ciencias Agropecuarias (FICA), evaluaron la utilización del almidón en función de la raza y tamaño (en relación a la edad) del animal. En el ensayo se planteó conocer la variabilidad en la excreción de almidón entre

bovinos y determinar la interacción entre edades y razas, analizando raciones y heces. Los resultados mostraron diferencias significativas en el porcentaje de almidón en heces (media de 19,31% \pm 4,71), determinando una eficiencia entre el 60,13% y el 72,33%, no difiriendo estadísticamente entre razas y sí entre tamaños corporales (Miguelo *et al.*; 2010). Estos resultados coincidieron con el trabajo de Krehbiel y colaboradores (2003), quienes no encontraron diferencias en la digestibilidad de dietas altas en concentrados entre novillos *Bos indicus* y *Bos taurus*. El consumo residual de alimento (CRA o RFI por su sigla en inglés) es un indicador que determina la eficiencia de utilización de los nutrientes, siendo uno de los principales determinantes el consumo animal. Nkrumah y otros (2004), reportaron que novillos seleccionados por bajo RFI (mayor eficiencia), presentan mayor el pH y porcentaje de materia seca en heces, sugiriendo que este ganado puede ser más eficiente en la digestión de almidón en intestino delgado. Coincide al relacionarlo con nuestros resultados de ensayo sobre eficiencia de uso de almidón, siendo el tamaño corporal, por consecuencia el consumo, que determinan la eficiencia de uso del almidón. Si bien el RFI es un buen indicador de eficiencia productiva del animal, algunas investigaciones no han encontrado respuesta favorable al relacionarlo con la emisión de CH₄ (Mercadante, comunicación personal). Una manera de aumentar la digestibilidad del almidón en rumen es a través de la molienda fina del grano, generándose como contrapartida, la disminución de la digestibilidad de la FDN y baja la producción de proteína microbiana (Firkins *et al.*, 2001). El cambio de digestión del almidón hacia la primera sección del intestino aumenta la retención del N₂ tisular, disminuyendo el N₂ excretado en la orina (Reynolds *et al.*, 2001). En relación a esto, Weiss y Pino (2009) documentaron la disminución de NH₃ del estiércol al aumentar los niveles de almidón digestibles en la dieta, mostrando como la fuente y calidad del alimento interactúan con la eficiencia de captura de la proteína de la dieta.

5.1.2.2 GLUTEN FEED DE MAÍZ (GF)

Actualmente el uso de productos derivados de la industria avanza en la inclusión de raciones animales. Los efectos de los subproductos en la dieta de bovinos presentan un fuerte impacto al medio ambiente, y en la producción de leche y carne, coincidiendo en esto varios estudios, desde distintos enfoques (FAO, 2011; Kristensen *et al.*, 2011). El crecimiento de la producción de etanol a partir de maíz ha incrementado la

disponibilidad de residuos industriales como son los conocidos granos de destilería con solubles (DGS), el cual es un recurso importante, por su calidad y bajo costo, para dietas de bovinos en terminación (Di Lorenzo y Galyean, 2010; Hales *et al.*, 2012). Sin embargo, se reportan resultados dispares en su estudio en la adición a raciones. McGinny otros (2009) determinaron una disminución en la ganancia de peso en bovinos de carne, al remplazar los granos de destilería por granos de maíz y soja en la dieta de terminación, mientras que el equipo de Belyea (2010) observó un incremento en la producción, y Hales (2012) no muestra modificaciones significativas en la respuesta animal. Desde una visión ambiental, existe bibliografía que relaciona la emisión de CH₄ con el uso de granos de destilería con soluble húmedos (WDGS) (Beauchemin y McGinn, 2006), no encontrando estudios en este sentido con gluten feed de maíz (GF), a pesar de ser muy similares. Ambos derivan de la molienda del grano de maíz (GM), siendo el GF producto de un proceso industrial destinado a producir jarabe de alto contenido de fructosa para uso humano. El GF es un alimento alto en proteína (20 a 25% PB) y energía (EM de 2.7 a 3 Mcal*Kg MS⁻¹), a pesar que el almidón del grano es extraído, su energía se debe al tipo de fibra altamente digestible. Actualmente, existe controversia y vacíos sobre los efectos en la dieta animal, debido al elevado porcentaje de azufre que incrementa la incidencia de casos de polioencefalomalacia (Uwituze *et al.*, 2011), la falta de fibra efectiva que no estimula la salivación ni la rumia (Di Lorenzo y Galyean, 2010), determinando una muy baja la ganancia diaria de peso (Drewnoski *et al.*, 2013), sin embargo estudios recientes realizados en los predios de la EEA, San Luis por el grupo de trabajo de Frasinelli en recría de novillos, no mostraron trastornos de salud con resultados aceptables (Frasinelli *et al.*, 2014a,b) Considerando este subproducto proteico y energético clave para la producción sustentable al tratarse de insumos de segunda y tercera generación, se considera su estudio en esta tesis. En este capítulo se hipotetiza, la existencia de relación directa de los nutrientes presentes en GF húmedo de maíz sobre la concentración de gases ruminales, y en una segunda etapa se evalúa la concentración de gases y la respuesta animal. Para comprobar la aseveración, se diseñaron ensayos en base a dietas con distintas proporciones de GF en la dieta.

5.2 MATERIALES Y MÉTODOS

Los ensayos fueron conducidos en la EEA San Luis del INTA (Lat: 33°39'50" S, Long: 65°24'37" W). El período experimental se dividió en dos etapas comprendiendo

los años 2011/2012 y 2013/2014. Cada periodo se diseñó de acuerdo al objetivo de evaluación, coincidiendo en los primeros 25 días con el tiempo de adaptación a las distintas dietas, y los últimos 5 para la medición de gases ruminales. Se suministró alimento una vez al día, asegurando un consumo *ad libitum* de agua. Todos los procedimientos con animales para uso experimental bajo criterio del Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio(CICUAL) de Argentina, siguiendo protocolos del Comité de Ética de animales de investigación de INTA. El estudio consistió en evaluar la concentración *in situ* de gases ruminales por animal con distintos porcentajes de GF en la ración. Las proporciones fueron 20, 40, 50, 85 y 100 % en base seca. En la Tabla XVI se muestran los componentes de las raciones utilizadas.

Tabla XVI: Proporción de ingredientes en las raciones experimentales en MS

Ingredientes		Nivel en la ración %MS					
		0	20	40	50	85	100
Gluten Feed Húmedo	GFh	0	20	40	50	85	100
<i>Eragrostis curvula</i>	pll	100				15	
Maíz quebrado	Mz		60				
Cáscara de maní	CM		7		50		
Harina zootécnica	HZ		9				
Núcleo vitamínico mineral	N		4				
Silaje de sorgo	SS			60			
TRATAMIENTO		1	2	3	4	5	6

HZ: subproducto del procesado de maíz por vía seca, constituido por mezcla de salvado, germen y almidón harinoso

A todos los tratamientos se le determinó la calidad nutritiva, para lo cual se toma de cada ración una muestra que se coloca en estufa con ventilación forzada a una temperatura de 55°C por 72 h. *A posteriori*, se toma una alícuota para ser llevada a estufa de 105°C y realizar correcciones de materia seca, el resto se muele hasta pasar por tamiz de 1 mm. Se determina: Materia Seca (AOAC, 1990), Nitrógeno Total por Kjeldhal (Jones, 1991) a partir de la cual se estima Proteína Bruta. A través del método modificado de Goering-Van Soest, (1970) utilizando el equipo de ANKOM 220 Fiber analyzer, se obtienen las fracciones de FDN y FDA de manera secuencial (<https://www.ankom.com>). Para la digestibilidad verdadera de la materia seca

(DVIVMS) se utiliza el equipo Daisy II, ANKOM Technology, y en base a este porcentaje se estima energía metabólica (EM). Se realiza un análisis de correlación entre las variables que determinan la calidad de la dieta y la concentración de GF. Para la representación gráfica se realiza un Biplot con el objeto de representar varias variables.

En la primera etapa se evalúa la concentración de gases ruminales (CH_4 , NH_3 y SH_2) en raciones con 20,50 y 85% de GF. En la segunda etapa se buscó relacionar la respuesta productiva con la concentración de gases ruminales, comparando una dieta a base de GF (no aconsejada), y la otra al 40%, indicada como referente de acuerdo a la bibliografía consultada.

5.2.1 MEDICIÓN DE GASES RUMINALES

Se asignan 2 novillos *Aberdeen Angus* microfistulados, de aproximadamente 14 meses de edad con 280 kg peso vivo, para cada tratamiento. Los animales se mantuvieron en boxes individuales con agua *ad libitum* por un período de 30 días, los primeros 25 días corresponde a la adaptación de cada ración, y en la última semana se realiza la medición. En este periodo, todos los días a la 1:00 pm (5 h pos-alimentación), los animales son llevados al cepo donde se ensambla el equipo detector de gases portátil. La porción externa de la cánula se conecta a un tubo conector, que a través de una manguera, se conecta a la sonda del aparato lector de gases. En el procedimiento de medición el volumen de aire ingresa a la sonda por acción de la bomba de aspiración y, transcurridos 15 segundos para su estabilización, se lee la concentración en la pantalla del equipo como se describe en el Capítulo 3.

5.2.2 RESPUESTA ANIMAL

En la segunda fase, se busca relacionar los gases con la respuesta animal de animales alimentados sólo con GF y otros con mezcla GF y silaje de sorgo (40:60 en base seca), registrando la evolución del peso vivo diaria a través de pesadas semanales sin desbaste previo, por un periodo de 100 días. Se utilizaron 40 novillitos de raza *Aberdeen Angus* de 6 meses de edad y una media de 117 kg de peso vivo inicial. Se midió el consumo de materia seca grupal durante 3 días consecutivos cada 25 días.

5.2.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El arreglo experimental utilizado para la evaluación de gases ruminales con animales fistulados fue en bloques completos aleatorizados, utilizando al tipo de gas

como factor de bloquización. El uso de un tipo de gas (CH₄, NH₃ y H₂S), como bloque reduce la variación del error experimental porque aísla la variación entre las concentraciones de gases y de la variación entre las dietas. En la ecuación 10 se presenta el modelo para el análisis de la varianza en un diseño en bloques completos.

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \beta_j + \varepsilon_{ij}$$

Ecuación 10

i= Hace referencia al tratamiento

j= Hace referencia al bloque

μ = Corresponde a la media general

τ_i = Hace referencia al efecto del i-ésimo tratamiento,

β_j = Refiere al efecto del j-ésimo bloque

ε_{ij} = representa errores normales e independientes

Para conocer la variabilidad conjunta de algún parámetro característico de la dieta y los gases CH₄, SH₂ y NH₃ se determina el coeficiente de correlación y regresión. Para el estudio de la performance animal, se diseñaron dos tratamientos, con dos repeticiones de 10 animales cada una. El análisis estadístico se basó en la comparación de dos muestras independientes (novillos alimentados solo con GF, y novillos alimentados con una mezcla 40:60 de GF:silo de sorgo). El modelo estadístico para esta situación experimental, matemáticamente se expresa como lo indicado en Cap. 4, ecuación 9, donde para esta situación, i hace referencia al animal; j, se refiere al tipo de tratamiento; t al efecto de la dieta sobre el animal t_j (se supone que actúa uniformemente sobre los animales que integran una dieta en particular), y ε_{ij} , varía de unidad experimental a unidad experimental, es decir, de animal a animal dentro de cada grupo. Refleja todo tipo de variabilidad que no ha sido investigada, es el error experimental. Se estimaron mediante regresiones y se compararon las medias de ganancia de peso vivo entre los dos tratamientos con el test de Tukey, $\alpha=5\%$. La información fue analizada con software estadístico “R”

5.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla XVII se presentan los resultados de las características químicas y respuesta animal de las raciones evaluadas.

Tabla XVII: Características químicas de las raciones evaluadas.

Etapa	GF %	MS %	FDN g/kgMS	FDA g/kgMS	PB g/kgMS	DMS %	CMS g/kgPV ^{0.75}	GDPV g/kgPV ^{0.75}
1	0	60	720	325	66	63	94.97	0
1	20	84,9	311;	83	126	80,0	89,8	17.97
1	50	50	606	330	150	59.1	97.89	7.30
1	85	42	460	80	200	80	115.83	12.93
2	40	31.4	532	259	129	68.7	108.37	11.80
2	100	42.9	439	122	235	79.4	101.96	12.85

* letras distintas (mayúsculas, minúsculas, cuales) indican diferencias significativas entre tratamiento (p<0.05)

MS: Materia Seca. FDN: Fibra Detergente Neutro. FDA: Fibra Detergente Ácida. PB: Proteína Bruta. CMS: consumo MS por unidad de tamaño metabólico. GDPV: ganancia diaria de peso vivo por unidad de tamaño metabólico.

Se observa una amplia variabilidad en los parámetros químicos entre los tratamientos, esto es esperable debido a la diversidad en tipo y cantidad de alimentos que constituyen las raciones, las cuales fueron armadas representando dietas frecuentes de los sistemas productivos de carne en la provincia de San Luis. En un sentido amplio, a través de un análisis de correlación entre los tratamientos y los diferentes factores, se puede decir que hay una relación directa y proporcional entre los tratamientos y PB, es decir, a medida que aumenta la concentración de GF mayor es el valor de la PB en la ración y menor el contenido de fibras (Tabla XVIII).

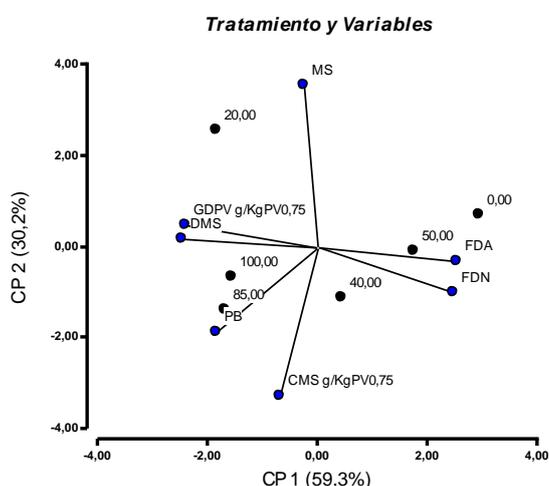
Tabla XVIII: Efecto sobre la Correlación de Pearson de la concentración de GF y calidad de la dieta.

Variabes	Correlación
MS %	-0.55
FDNg/kgMS	-0.37
FDAg/kgMS	-0.50
PBg/kgMS	0.98
DMS%	0.49
CMS g/kgPV ^{0.75}	0.63
GDPV g/kgPV ^{0.75}	0.41

A través de la representación gráfica de datos multivariantes que hacen a la calidad de la dieta, se pone de manifiesto de una manera sencilla, similar a un diagrama de dispersión, pero que considerando las estructuras de covariación multivariantes, las relaciones con la concentración de GF en la ración. En el biplot (Fig.21) es posible interpretar simultáneamente la posición de la inclusión de GF, representada por los tratamientos (puntos); de los indicadores nutricionales, representados mediante

vectores; y de las relaciones entre ambos, en el plano con mayor capacidad informativa. Esto permite analizar la situación de cada tratamiento e identificar aquéllos que muestran un comportamiento singular. La representación gráfica de los vectores muestran que existe una alta correlación positiva debido a la asociación en ángulos agudos, entre la DMS y GDPV (determinada por la ración con 20% GF), y FDN con FDA, relacionadas principalmente con las mezclas de 40 y 50% de GF. Diferente es la relación formando ángulos obtusos, debido que indican correlación negativa, como es el caso de la MS y CMS. Cuando los vectores forman ángulos rectos, no existe relación entre las variables, como es el caso de la MS/DMS, y PB/FDN.

FIGURA 21: Relación entre la inclusión de GF en la ración y los parámetros nutritivos.



En la Tabla XIX se muestra la concentración media de los gases ruminales correspondiente a la primera etapa, medido cinco horas pos-alimentación.

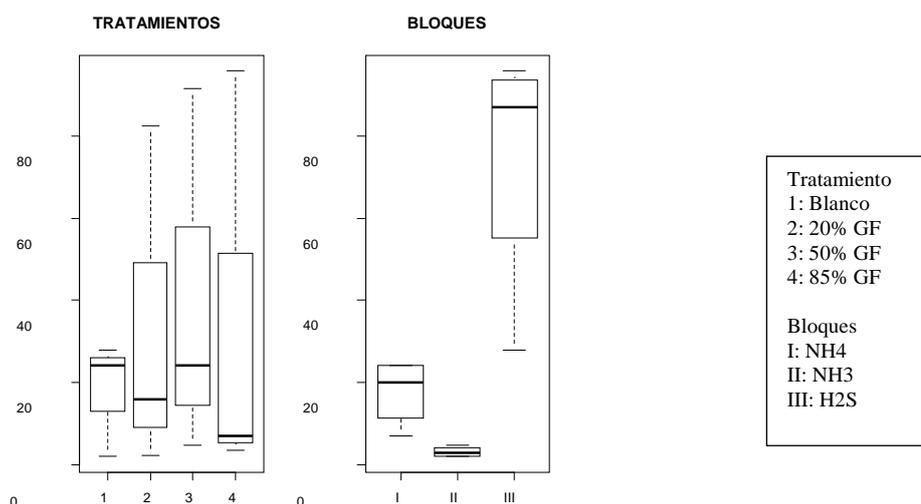
Tabla XIX: Concentración media de los gases ruminales en dietas con GF.

GF MS%	Bloque1 CH ₄ %	Bloque2 NH ₃ %	Bloque3 H ₂ S ppm
0	24.19 (2.1)	2.2 (1.1)	27.86 (2.5)
20	15.88 (2.3)	2.27 (2.2)	82.5 (34.91)
40	13.49 (3.5)	3.85 (0.5)	86.87 (23.5)
50	24.15 (3.2)	4.77 (0.5)	91.55(15.2)
85	7.00 (0.5)	3.58 (1.1)	95.77 (17)
100	18.54 (5.3)	8.45 (0.15)	100 (15.3)

(...) desvíos estándar

Se observa alta dispersión en los datos, tanto, entre los bloques como dentro de ellos (Fig.22). El test de Shapiro-Wilk (p-value = 0.0033) corrobora la no normalidad de los datos.

FIGURA 22: Dispersión de resultados entre los tratamientos y bloques



El Test de Kruskal-Wallis (no paramétrico) comprueba que no existe diferencia en las medias de los tratamientos (p-valor= 0.9634), no así en los bloques con $p = 0.0072$, aceptando la hipótesis alternativa. Para saber entre cuales bloques existe diferencia significativa se realizó el Test de Nemenyi de comparaciones múltiples basadas en la suma de rangos, indicando la diferencia significativa entre II/III (es decir la concentración ruminal de NH_3 y H_2S), y I/III (Tabla XX).

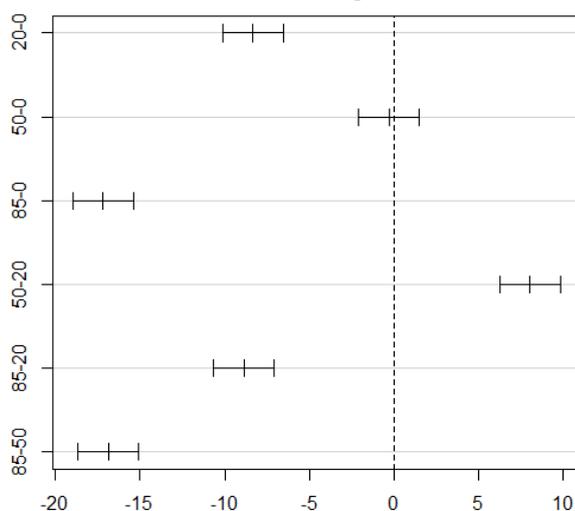
Tabla XX: Test de Nemenyi en los bloques de NH_3 , H_2S y CH_4

Bloque	I (CH_4)	II (NH_3)
II (NH_3)	0.5786	
III (H_2S)	0.0159	0.0048

Esto es esperable debido a la fisiología del rumen, cuya composición es aproximadamente de 65% de CO_2 , 27% de CH_4 , 7% de N_2 , 0,6% de O_2 , 0,2% de H_2 y 0,01% de H_2S (Yokohama y Johnson, 1988), lo que hace que CH_4 y NH_3 difiera estadísticamente de la concentración de H_2S en rumen.

Cuando se analizó a cada gas en particular, la producción de CH₄ abarcó un rango del 7 al 25% como porcentaje en volumen (%Vol.). El efecto que tuvieron los niveles de gluten sobre la producción de CH₄ fue altamente significativo ($p=3.81e^{-09}$), mostrando un comportamiento cuadrático. Las medias de Tukey para nivel de confianza 95%, indican que sólo entre blanco y la ración con 50% GF la diferencia es no significativa (Fig. 23) y esto concuerda con las conclusiones del biplot, donde ambos tratamientos son homogéneos.

FIGURA23: Diferencia en la generación de CH₄ con diferentes concentraciones de GF



A través del Test de Pearson se busca la correlación entre CH₄ y la digestibilidad, existiendo relación (Test de Pearson p-valor=0.1128), cuyo grado de intensidad fue negativa y alta ($r= -0.89$). El mejor ajuste de regresión a la nube de puntos por el método de mínimos cuadrados, se obtuvo con la digestibilidad. (Ec.11). El coeficiente de regresión (R^2) nos indica que el 58% de la variación de CH₄ dependerá de la digestibilidad de la dieta. Cuando consideramos la fibra (FDN), la relación es positiva (Test de Pearson p-valor = 0.3419) con una correlación del 66% ($r=0.6$), pero el coeficiente de determinación fue bajo $R^2=0,43$.

$$CH_4^2 = -17.52 * x + 159.02 \quad R= 0.58 \quad \text{Ecuación 11}$$

x= Digestibilidad de MS en porcentaje.

Del análisis del CH₄ se observa que el factor más influyente en la producción fue la digestibilidad, pero de forma inversa, a mayor digestibilidad menor producción de CH₄, coincidiendo con los resultados de otros artículos científicos (Jonhson y Johnson,

1995; Martin *et al.*, 2010). La mayor digestibilidad de las raciones en estudio fueron las que tuvieron mayor porcentaje de granos de maíz, por ende mayor contenido de almidón, no así con GF. Se sabe que la digestibilidad afecta el consumo de MS, y este influye sobre la producción de CH₄ entérico (Buddle *et al.*, 2011). Las primeras investigaciones encontraron una mayor producción de CH₄ en dietas de baja digestibilidad a un nivel de consumo de mantenimiento, disminuyendo 30% la producción de CH₄ con dietas con alta digestibilidad y un consumo tres veces mayor al de mantenimiento (Blaxter y Clapperton, 1965). Moss y otros (1995) remarcan que la producción de CH₄ esta principalmente relacionado con el consumo de MS dependiendo del contenido de fibra y calidad de la dieta, coincidiendo con nuestro análisis de correlación, donde la FDN es el segundo componente, después de digestibilidad, que afecta la emisión de CH₄, pero en este caso se relacionan directamente, a mayor fibra, mayor emisión de CH₄. El mayor consumo de MS se relaciona con una mayor tasa de paso y la disminución en la degradabilidad de la dieta, lo que resulta en una menor producción de metano (Pinares-Patiño *et al.*, 2003). A su vez, el aumento en el nivel de consumo en dietas ricas en forrajes disminuye las emisiones de metano por unidad de materia seca consumida entre un 11 a 14% que representa la mitad de lo obtenido por Blaxter y Clapperton (1965), debido probablemente a la poca variabilidad en composición química y digestibilidad de los forrajes (Hammond *et al.*, 2011). El mayor consumo de nutrientes induciría a la actividad microbiana, generando mayor cantidad de AGV, que reduciría el pH del fluido ruminal afectando a MO sensibles como los protozoos y bacterias celulíticas, las cuales colectivamente disminuyen la metanogénesis (Martin *et al.*, 2010). Sin embargo, el GF se caracteriza por tener fibra de alta digestibilidad, lo que aumentaría la población de bacterias celulíticas, lo que muestra los efectos contradictorios que se dan en el rumen. La menor emisión se obtiene en el tratamiento con 85% GF y no 100% GF, esto podría sugerir un efecto aditivo del grano de maíz en la mayor concentración y digestibilidad que disminuyen los H⁺ disponibles para los metanógenos. Como ya se ha mencionado, el GF es un suplemento considerado proteico, con un valor promedio de PB del 23.5% (Tabla XVII), pudiendo a través de la proteólisis ruminal reducir simultáneamente la pérdida de N en el rumen y metanogénesis debido a que contribuiría a atrapar el N de la dieta, como N microbiano (Kingston-Smith *et al.*, 2010). En el caso de la metanogénesis, investigaciones *in vitro* han demostrado una asociación inversa entre la concentración de proteína cruda y las emisiones de metano. En ensayos donde se comparó *ryegrass perenne* con 5% más

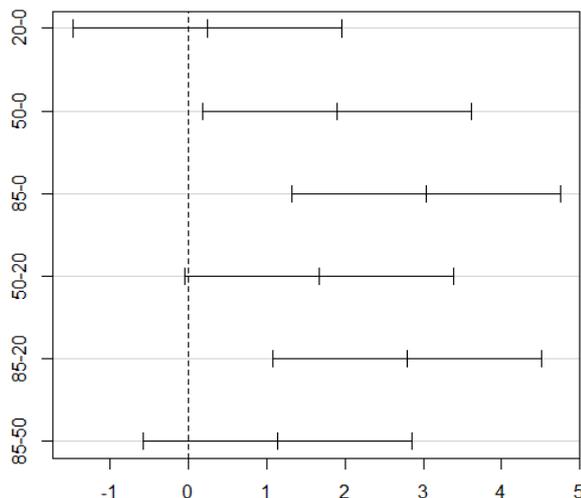
proteína cruda, se reportó 14% menos metano por unidad de materia orgánica degradada (Lovett *et al.*, 2004), y una disminución del 7% por unidad de MS incubada cuando el ryegrass tenía 3% más de proteína cruda (Navarro-Villa *et al.*, 2011). En este punto se debe analizar también otro gas ruminal que es el NH₃. El porcentaje de GF se relaciona con el NH₃, excepto en el tratamiento 5, que podría deberse a la actividad de bacterias estimuladas con el agregado de hidratos de carbono. En el GF a las pocas horas de su ingestión aproximadamente el 25% del nitrato ingerido ha sido reducido a nitrito que posteriormente es reducido a hidroxilamina y amoníaco. En el proceso de nitroreducción los MO utilizan 8 equivalentes de electrones que de otra forma habrían empleado en la producción de metano (CH₄) desde dióxido de carbono (CO₂), lo que indica una alternativa de mitigación actuando como aceptor de electrones, sin embargo se deben considerar los productos resultantes y velocidad de la reacciones en rumen, para no causar intoxicación de nitritos, ya que el nitrato se reduce a nitrito más rápido que este a amoníaco.

$$NH_3^{-2} = -0.14 * X + 0.33$$

Ecuación 12

X el porcentaje de la PB.

FIGURA24: Diferencia de NH₃ ruminal entre distintas inclusiones de GF.



En este trabajo, la concentración de amoníaco (NH₃) también difiere entre algunos tratamientos (p= 0.0014), no encontrando diferencia entre 85/50%, y el blanco con un 20% GF, de acuerdo a Tukey con un nivel de confianza del 95% como lo indica la figura4. Si bien existe relación con la digestibilidad de la ración (p= 0.6671), el

coeficiente de determinación es bajo $R^2= 0.11$, contrariamente a lo que sucede con la PB cuya relación es positiva, con un $R^2=0.70$. La concentración promedio de NH_3 ruminal reportada en la literatura fluctúa desde 2 y 50 mg por 100 ml de fluido ruminal (0.2 y 5%), aumentando con el porcentaje de proteína dietaria. Se ha determinado que concentraciones entre 5 y 10 mg NH_3 serían las óptimas, no limitando el crecimiento microbiano, según resultados obtenidos tanto *in vivo* como *in vitro*; obteniendo este nivel con valores del 11 al 14% de proteína bruta en la dieta (Guzmán *et al.*, 2012). Nuestras mediciones oscilan entre 20 a 84 mg de NH_3 cada 100 ml de fluido ruminal, lo que indicaría que estamos muy excedidos en algunos tratamientos, lo que se debería al exceso de PB de las raciones (6 a 23.5%). Es importante considerar el ciclo de la urea, cuando la producción de NH_3 sobrepasa la capacidad de las bacterias el amoníaco es absorbido a través de la pared ruminal y vía sanguínea transportado al hígado, donde es transformado a urea, pudiendo ser reciclado hacia rumen ya sea vía saliva o sanguínea, aunque normalmente la mayoría es excretado por la orina, generando un costo extra de energía. Además, cuando se sobrepasa la capacidad de detoxificación del hígado sobrevienen diversas alteraciones metabólicas, pudiendo producirse una intoxicación por amonio. En nuestros ensayos la menor concentración ruminal se obtuvo con el pasto llorón, quizás se corresponde con el bajo valor proteico y alto contenido de fibra, lo que establece un desfase en el tiempo, entre la formación del NH_3 y la fermentación de los carbohidratos estructurales para la síntesis de MO, como se observa en el tratamiento con 20% GF. En los tratamientos que presentan altos valores proteicos (PB >15%), y sin limitantes de energía, se produce una caída en la eficiencia productiva (Frasinelli *et al.*, 2012), quizás por el costo energético de eliminación del NH_3 , por un lado, y la variabilidad de la biomasa microbiana, determinando diferencias en las tasas de división y flujo ruminal, respondiendo a los nutrientes del alimento. Para aspectos prácticos, la proporción de carbohidratos solubles y carbohidratos estructurales óptima para una máxima síntesis de proteína microbiana (PM) oscila alrededor de 2.3 a 3.3 (cociente entre el extracto no nitrogenado y fibra cruda (ENN: FC)). Cuando existe excedente, éste es excretado en heces y orina por lo cual los rumiantes contribuyen indirectamente con la emisión de N_2O (gas de efecto invernadero con un equivalente potencial de 310 kg CO_2eq). Los animales excretan el N en forma de urea, la cual una vez en el suelo es utilizado por microorganismos del suelo y transformado en nitratos (NO_3) por nitrificación que mediante el proceso de desnitrificación se emite a la atmósfera en forma de N_2O (Di *et al.*, 2012).

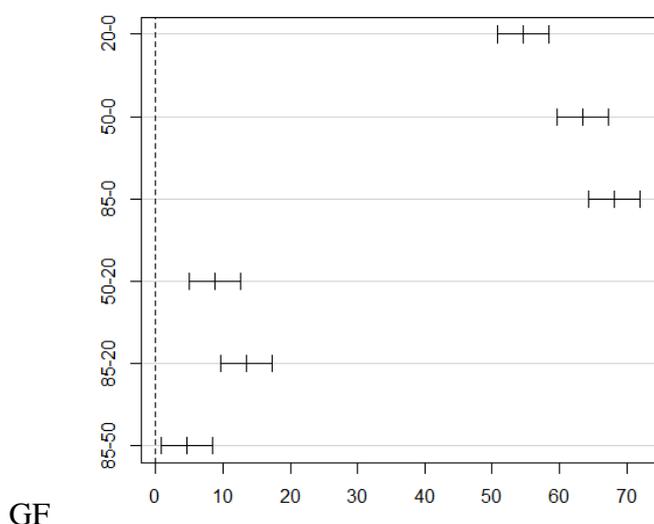
Para el gas entérico H₂S, la mayor correlación y coeficiente de determinación (R²= 0.73) Di, obtuvo en con un 80%de inclusión de GF. Todos los tratamientos difieren significativamente (p-valor del 3.17⁻¹¹) como se observa en la Fig. 25. El mejor ajuste se generó con la ecuación 13:

$$H_2S^2 = 87 * X + 2889$$

Ecuación 13

X porcentaje de GF

FIGURA25: Diferencia de H₂S ruminal entre distintas inclusiones de

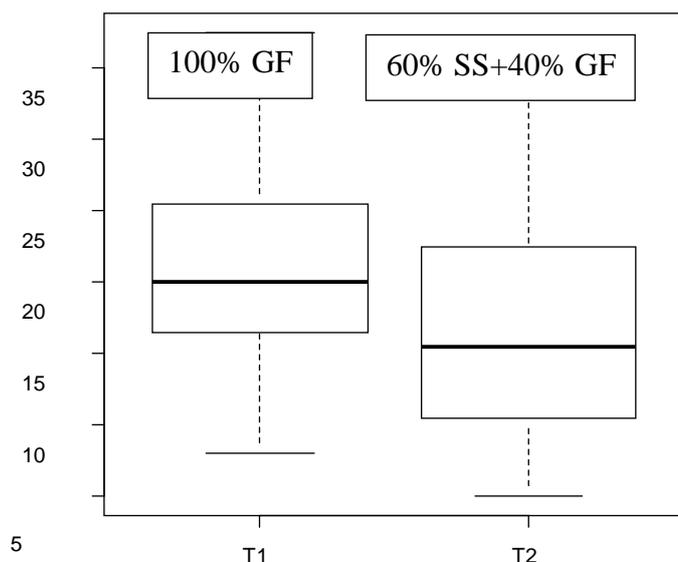


La importancia de este gas se debe a que el azufre (S) es tóxico (en 1996 el NRC fijó el nivel máximo de tolerancia 0.4% en base seca) y se cree que la acumulación en el rumen es a través de la ingesta de alimentos y agua. El GF presenta alta concentración de azufre (0.3%), debido al ácido sulfúrico (H₂SO₄) usado en la hidrólisis húmeda a que es sometido el maíz para la obtención de fructosa. Los rumiantes son más vulnerables a la poliencefalomalacia (PEM) cuando su dieta es cambiada abruptamente, de una dieta de forraje a una de grano. Este cambio modifica drásticamente la población microbiana del rumen que produce tiaminasa, además, el exceso de S interfiere con la absorción y metabolismo del cobre. Cuando altos niveles S dietético son administrados durante un período largo, los niveles de cobre en la dieta también se deben incrementar (Sager comun. personal).

En el segundo ensayo se compararon animales que consumieron solo gluten y otros con el agregado de fibra, 60% de silaje de sorgo y resto GF (40%). La diferencia

de las emisiones de CH₄ fue baja, la prueba t-Student para los dos tratamientos dio $p=0.0509$, lo que indica que se encuentra en el límite de la significancia al 5% (Fig. 26). Esto condice con las conclusiones del ensayo anterior, donde ambos parámetros, FDN y DMS, definen la producción de CH₄.

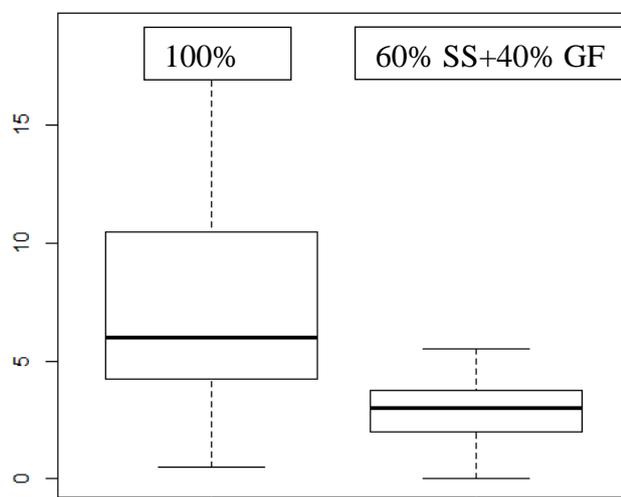
FIGURA 26: Concentración de CH₄ ruminal en dietas con



GF

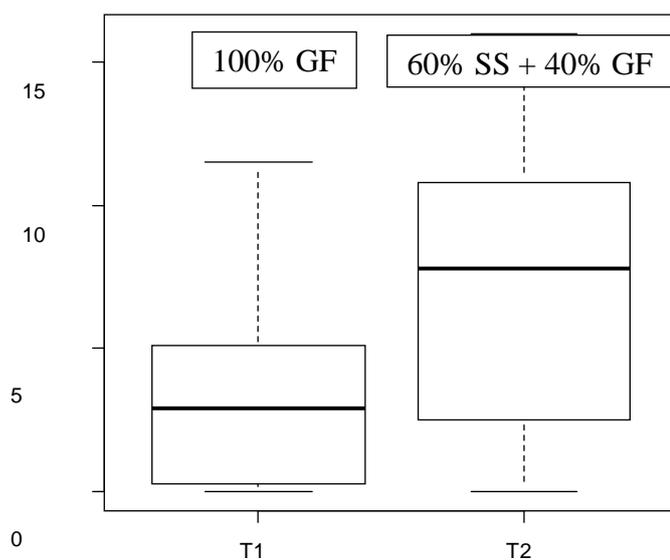
Contrariamente, las medias de la producción NH₃ son altamente significativa ($p=1.646^{-07}$), siendo mayor en el tratamiento con gluten sólo, esto se condice con los valores de PB con 23.5% para 100% GF, y 12.6% para 40% GF, siendo ambos significativos. En el gráfico de cajas, se observa la alta dispersión en los resultados de gas en rumen (Fig. 27).

FIGURA 27 Concentración de NH₃ ruminal en dietas con GF



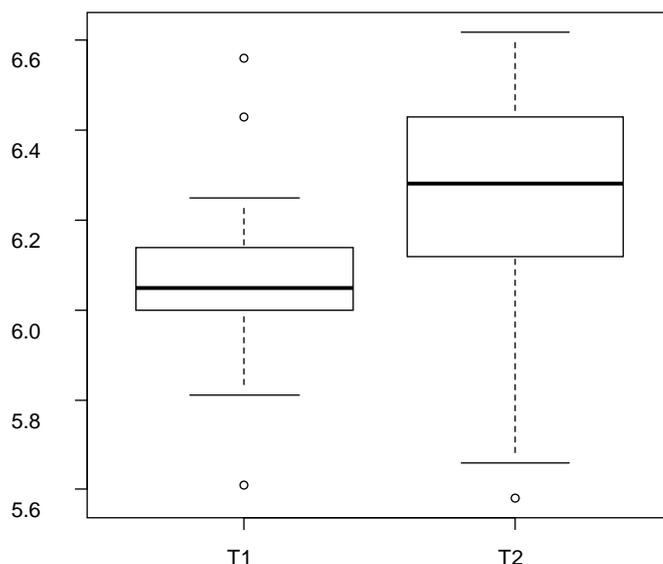
El oxígeno fue el único gas entérico que presentó mayor concentración para 40% de GF (Fig. 28), siendo esta diferencia significativa (Student $p=0.00989$)

FIGURA 28: Concentración de O_2 ruminal en dietas con GF



El otro parámetro medido, pH, se diferenció significativamente entre los tratamientos ($p=0.03$), indicando mayor basicidad el T3 con un valor medio de 6.23, versus 6.05 para T6. (Fig. 29).

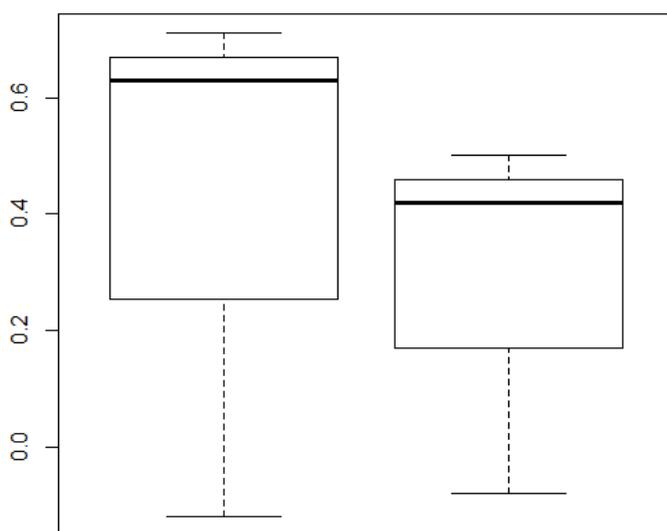
FIGURA 29: pH ruminal en dietas con GF



La acidez del GF (pH 4) no afectó el pH ruminal, ello puede deberse a que en el proceso de desaminación de los aa se produce un aumento en la capacidad tampón del líquido ruminal. El pKa básico del amoníaco permite absorber protones del medio y participar en el control del pH ruminal. Sauvant y otros (1999) sugiere que el papel del amoníaco en el control del pH ruminal depende fundamentalmente de la liberación de iones carbonato en el proceso de desaminación. Es posible que al menos parte de los efectos buffer de la desaminación, o el aporte de proteína degradable al rumen esté asociado al estímulo de la síntesis de proteína microbiana. Firkins y colaboradores (1985), indicaron que la sustitución en un 35% de forraje por gluten feed produce una reducción lineal del pH, disminuyendo también, la relación acetato/propionato. Fellner y Belyea (1991), formularon raciones para vacuno lechero a base de ensilado de maíz que contenían el 20, 40 y 60% de la MS de GF, observando al aumento del nivel de inclusión de gluten feed en las raciones, una reducción en la concentración ruminal de acetato, no afectando la digestibilidad del nitrógeno, fibra detergente neutro (FND), fibra detergente ácido (FAD) y almidones. Sin embargo, la sustitución en nuestro estudio es con granos de maíz, de lo que se esperaría mejor respuesta productiva, como se observa en el ensayo *in vivo*. Otro punto a destacar es la proteína degradable en rumen (PDR) del GF. Hoover y Stokes (1991) después de revisar varios trabajos *in vivo* e *in vitro*, determinaron que la eficacia máxima de síntesis de proteína bacteriana, y el mayor aporte de proteína bacteriana al duodeno se alcanza en dietas que contienen entre el 10 y el 13 % de proteína degradable en la ración, por otro lado, Hales (2014) se concentra en la determinación del metabolismo energético de estos subproductos

determinando una mayor eficiencia del mismo cuando se incluyen en un 15% en dietas a base de maíz tipo copos. Al considerar un 65% de PDR en GF, se evidencia un exceso importante de nitrógeno, principalmente en las ración 100% GF. En esta situaciones lo que sucede es una menor eficiencia en el uso de los nutrientes debido a un costo energético extra por el desdoblamiento de aa al transformarla en energía disponible para el animal. La ganancia de peso vivo diaria obtenida con las 2 raciones se representa en la Figura 30.

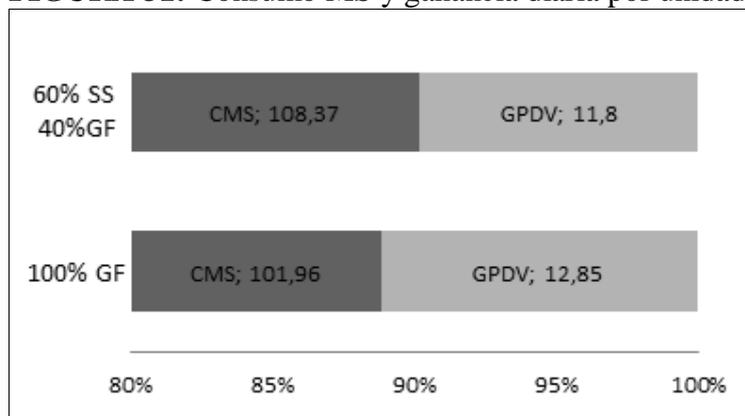
FIGURA 30: Ganancia de peso vivo en dietas con GF



El promedio general de la ganancia diaria de peso, entre el ganado alimentado con GF solo y mezcla, difieren significativamente ($P < 0.05$). Cuando se analizan separadamente los períodos de acostumbramiento, que corresponden a los primeros 21 días del ensayo, no hubo diferencia en la ganancia de peso de los animales alimentados con gluten solo o mezclado con silo. Sí se observó una baja en la condición corporal de los animales alimentados solamente a gluten, evidenciándose con la mayor pérdida de peso (-0.120 ± 0.34 kg), en comparación a los 0.08 ± 0.24 kg que bajaron con la mezcla. El comportamiento en el período pos-acostumbramiento (21-107 días) mostró diferencias significativas en la ganancia de peso, correspondiente a $0.710 \pm 0.03 \text{ kg} \cdot \text{animal}^{-1} \cdot \text{día}^{-1}$ para GF, y 0.500 ± 0.04 kg para GF+SS respectivamente. La Figura 31 denota el mejor índice de conversión de la dieta 100% GF, porque los animales consumieron menos alimento y depositaron mayor cantidad de kilos de carne. Esta mayor ganancia de peso del GF puede deberse a la menor digestibilidad de la fibra del silo de sorgo y menor contenido de proteína, que causaría una deficiencia en la

proteínametabólica para el aumento de peso animal. Hammondy otros (2009), después de analizar una base de datos de 3000 animales (ovejas y vacas), encontraron que solo el 13% de la variación en la producción de CH₄ pudo ser explicada por la composición del pasto; por otro lado, Hales *et al.*(2014), en un trabajo reciente sobre los efectos en la performance en la terminación de animales a corral con incremento WDGS, en dietas a base copos de grano de maíz, concluyen que la producción de metano en función a la EB se incrementa linealmente con el incremento de la inclusión de los granos de destilería, pero disminuye la energía retenida asociada a una mayor pérdida energética por heces, como también excreción de N total. En este estudio no se consideran las emisiones generadas por las heces, lo cual podría afectar la mejora del sistema reflejada con el animal.

FIGURA 31: Consumo MS y ganancia diaria por unidad de tamaño metabólico.



5.4 CONCLUSIÓN

En el presente capítulo se examinaron las relaciones existentes entre los gases entéricos, (principalmente CH₄, NH₃y H₂S) y factores de la dieta animal. Los subproductos industriales se proyectan como alternativa para reducir los gases de efecto invernadero provenientes de los rumiantes, considerando conveniente evaluar la inocuidad en la salud de los animales, como su uso racional y respuesta animal, de modo que permita aumentar la productividad de manera eficiente y sustentable. En este capítulo, no se evaluaron las emisiones generadas por las excretas, sin embargo, conocemos la necesidad de integrar la generación de GEI de modo tal que permita evaluar los diferentes escenarios de las actividades del sector ganadero bajo un enfoque global, y determinar una verdadera mitigación de los efectos de las emisiones de los

gases entéricos ruminales. Para satisfacer la demanda de carne del planeta protegiendo el medio ambiente.

Capítulo 6:

RELACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE GASES ENTÉRICOS CON EL BIENESTAR Y SALUD ANIMAL

6.1 INTRODUCCIÓN

Los rumiantes son componentes clave para el mantenimiento de los pastizales a nivel mundial, por un lado, al transformar la fibra contenida en las pasturas en proteína de alto valor biológico, y por otro, la conservación de estos sistemas brindan importantes servicios, como mantener o incrementar reservorios de carbono, prevenir la erosión, producir, mejorar la calidad del agua y mantener una importante biodiversidad animal y vegetal, produciendo con buenas prácticas y criterios de sustentabilidad ambiental. Sin embargo, la producción animal y el cambio climático tienen una relación compleja y multi-direccional. Por un lado, la producción animal influye sobre el cambio climático, al generar gases de efecto invernadero (CH_4 y N_2O) y por otra parte, el cambio climático influye sobre la ganadería al afectar la dinámica del proceso salud/enfermedad, y también su base de sustentación: la productividad de los ecosistemas y la disponibilidad de agua. El IPCC (2007) informó que la producción animal se verá afectada en forma directa e indirecta por el cambio climático. Los efectos directos involucran intercambio de calor entre el animal y su ambiente, que influyen sobre la respuesta animal, salud y bienestar animal. Los efectos indirectos incluyen la influencia del clima sobre la cantidad y calidad de forrajes y granos, la severidad y distribución de enfermedades y parásitos. Además, se debe considerar cómo afecta el estado nutricional sobre el nivel de vulnerabilidad del animal. Por lo tanto, la dieta afecta la salud y productividad animal, e indirectamente las emisiones de metano y óxidos nitrosos. La complejidad de las interacciones entre nutrición, sanidad, productividad y gases de efecto invernadero son difíciles de evaluar debido que, cambios en la salud provocan cambios de rutas metabólicas y utilización de nitrógeno. La nutrición y sanidad pueden afectar en la productividad, fertilidad y mortalidad generando un aumento o disminución en el número de animales para mantener la producción, lo que afecta las emisiones de CH_4 y N_2O totales del sistema productivo. Son varias las enfermedades de origen metabólicos incluyendo el término no solamente los clásicos desórdenes metabólicos resultantes de deficiencias y/o desequilibrios

nutricionales o asociadas a fallas en los mecanismos homeostáticos de control (como la cetosis clínica, la hipocalcemia puerperal, la tetania hipomagnesemia y algunas enfermedades de los estómagos, como la acidosis ruminal, el meteorismo espumoso y el desplazamiento del abomaso), sino también a todo un conjunto de afecciones clínicas y subclínicas, ligadas no sólo a la cantidad y calidad del alimento suministrado, sino también a la interacción entre los distintos nutrientes, la forma y tiempo de suministro de los alimentos, los niveles de producción y la forma en que los nutrientes son canalizados en forma diferencial a diferentes órganos y tejidos, por los mecanismos homeoréticos de control, de acuerdo al cuadro endocrinológico predominante en los diferentes estadios productivos y reproductivos por los que va atravesando el animal (Breukink *et al.*, 1992). Payne (1977) describió a estas enfermedades como trastornos del medio interno debido a desbalances de los nutrientes. En este capítulo se hará referencia a polioencefalomalacia (PEM), intoxicación por nitritos, neumonía intersticial atípica (NIA) y acidosis, al ser las de mayor predisposición como consecuencia de las raciones utilizadas en la tesis.

6.1.1 BIENESTAR ANIMAL

El conocimiento de la digestibilidad de los alimentos es básico para establecer su valor nutritivo, y ello, para la formulación de raciones de animales rumiantes; sin embargo, la determinación in vivo de la digestibilidad es un proceso laborioso, costoso y requiere el empleo de grandes cantidades de alimento, adicionándole numerosos factores, entre los que se destacan el tipo de ración, el nivel y pauta de ingestión de los alimentos, la especie animal y el estado fisiológico de los animales (Schneider y Flatt, 1975). Varios experimentos se han realizados para estudiar el efecto de la ración del animal donante de inóculos con ganado ovino (Ramanzin *et al.*, 1997), vacuno (Jaakola y Huhtanen, 1993) y caprino (Kawas *et al.*, 1991). En la evaluación de alimentos se cuantifican entidades químicas, razón por lo cual se destacan los métodos biológicos, a los cuales se les establece sus asociaciones con la respuesta animal (France *et al.*, 2000). En este método es necesario el uso de animales donantes de licor ruminal, los cuales están crónicamente fistulados en rumen, siendo numerosos los problemas que surgen de su mantenimiento (Mauricio 2001), como por ejemplo, intervenciones quirúrgicas costosas, infecciones en especial en las zonas tropicales, adicionando el problema de que el inóculo ruminal no es un fiel representante de ese ambiente en lo que se refiere a

cantidad y calidad de microorganismos. Omed (2000) encontró que las heces presentan un alto potencial como alternativa de inóculo en las técnicas de digestibilidad *in vitro*; como así también para la técnicas de gases (Aiple *et al.*; 1992), considerando una ventaja de este inóculo la inespecificidad de los microorganismos por el sustrato (Ørskov *et al.*, 1970,1972). Varios son los autores que coinciden con lo antes dicho; utilizando heces de distintos rumiantes, como en el caso de ovejas (Mann y Orskov, 1973; Lewis y Dehority, 1985; Vãradyová *et al.*, 2005), heces de ganado bovino (Jones y Barnes, 1996; Holden, 1999; Mabjeesh *et al.*, 2000) y los más recientes estudios, de caballos (Lattimer *et al.*, 2007; Murray *et al.*, 2008). La necesidad de cuidar el bienestar de los animales usados para experimentación, que significa entre otras cosas, exponerlos al menor estrés posible durante la preparación, evaluación y recuperación de los procedimientos experimentales, exige que se reduzcan al mínimo posible procedimientos, que aunque muy cuidados y que no ponen en riesgo la vida de los animales, pueden generar alguna incomodidad. Por lo expuesto, sumado a la carencia de un método rápido y confiable que permita determinar el valor nutritivo de los alimentos de manera masiva en el laboratorio, se propone comparar la efectividad de recursos microbiales, fecales y ruminales, en la determinación de la digestibilidad verdadera *in vitro*, utilizando una misma muestra, como primer objetivo del capítulo. .

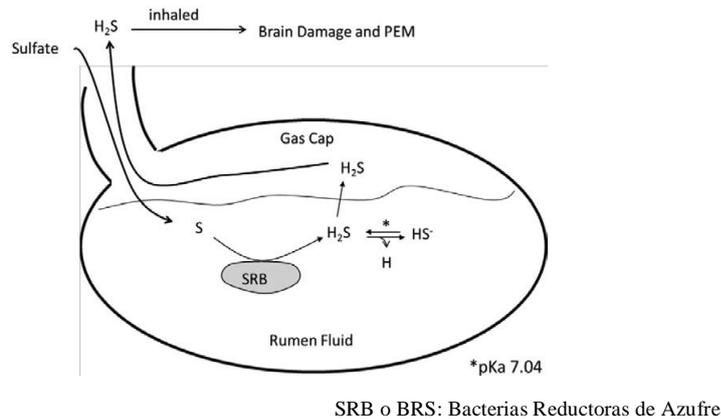
6.1.2.1. POLIENCEFALOMALCIA

Los subproductos de la industria del maíz, como gluten feed, son nutritivos y económicos como alimentos en la dieta de los rumiantes. Sin embargo, presentan desbalances nutricionales y concentración inadecuada de minerales en la dieta, compromete el crecimiento, la reproducción y la salud animal (NRC, 2005). El alto contenido de azufre del GF es debido a que en la molienda húmeda del grano se utiliza ácido sulfúrico, genera en el animal disminución en el consumo de MS, afectando la ganancia de peso (Kwiatkowski *et al.*, 2006). El azufre es un macroelemento que está presente aproximadamente en un 0,15 % del peso corporal en el rumiante. Los requerimientos diarios son 1500 a 2000 ppm, lo que equivale a un 0,15% del alimento en base a materia seca, siendo el valor máximo tolerable 0,4% (NRC, 2001), incorporándolo a través de la ingesta de alimentos y agua. Durante épocas de sequía, los sulfatos se concentran en el agua de bebida animal de origen subterráneo. Debido a la excesiva temperatura ambiental, los animales se encuentran más sedientos y, por ende, beben más agua. Por lo tanto, se recomienda que el agua para el ganado contenga menos

de 500 ppm de sulfatos. Klasing y otros (2005), determinaron que la tolerancia de rumiantes para la dieta azufradas varía inversamente con la proporción de concentrado en la dieta, siendo 0,35% con dietas menores a un 15% de forrajes y aumentando a 0,5% en dietas con niveles mayores al 40% de forraje. En el rumen, el sulfato (SO_4^{2-}) es reducido a sulfito (SO_3^{2-}) por las bacterias reductoras de sulfato, y convertido a H_2S en un proceso pH dependiente (Beauchamp *et al.*, 1984). Altas concentraciones puede generar el traspaso de sulfuro de hidrógeno al torrente sanguíneo, pudiendo afectar a los animales de variadas formas (Gould y col, 2002). Niveles altos de azufre pueden intervenir en la absorción y disponibilidad de otros metales (selenio y cobre) (NRC 2001), como así también se ha asociado a polioencefalomalacia (PEM) debido a que se considera que la PEM se produce por inhalación del H_2S al eructar el animal (Gould, 2000; Sager *et al.*, 1990). El gluten feed de maíz por su alto contenido S es causante de Polioencefalomalacia (PEM) en bovinos, de acuerdo a lo diagnosticado por Oklahoma Animal Disease Diagnostic Laboratory (OADDL) en el año 2000. La PEM es un desorden del sistema nervioso central en rumiantes, no infeccioso, causada por la acumulación ruminal, eructación y subsecuente inhalación de gran cantidad de H_2S (Gould, 1998). Aunque históricamente se la ha asociado con el metabolismo de la tiamina, se ha presentado en animales de engordes intensivos que consumen alimentos con alto porcentaje de azufre (Olkowski *et al.*, 1997). El daño de esta enfermedad se observa en la materia gris del cerebro, y también se ha reportado lesiones en pulmones (Sager *et al.*, 1990, Kerr *et al.*, 1989). Nichols y otros (2013), reportaron alta incidencia en bovinos de feedlot que consumieron dietas con 0.5% S y bajo contenido de fibras (4% FDN). Existe una correlación directa entre los niveles de H_2S ruminal y el azufre contenido en la dieta, niveles de 0,53% de azufre en la dieta generó 1100 ppm en rumen y 825 ppm cuando los niveles fueron 0,34%, siendo 1000 ppm sugerentes de toxicosis. En estos estudios se encontraron medidas mayores a 100ppm (límite superior del medidor portátil de gas), por ello, adicionalmente se determinó la concentración de H_2S mediante tubos detectores con una sensibilidad de 100 a 2000 ppm corroborando valores medidos con equipo Eagle, obteniendo valores máximos entre 500-1000 ppm, no mostrando síntomas de toxicidad. La generación de H_2S en rumen es debido al metabolismo de las bacterias reductoras de azufre (BRS) y bacterias desasimiladoras de azufre (BDS). A un pKa de 7.04 el H_2S puede convertirse en HS^- (Schoonmaker y Beitz, 2012), y al tener pH bajo, la cantidad de sulfuro en forma gaseosa aumenta. Dependiendo del pKa, a un pH 7 el 50% del H_2S se disocia, en un pH 5.5 sólo el 5% se

transforma en HS⁻ y el excedente es liberado en forma de gas en rumen, que es eructado y subsecuentemente inhalado pasando al torrente sanguíneo actuando como neurotóxico (Fig. 32).

FIGURA 32: Metabolismo de las Bacterias Ruminales de Azufre en rumen



Además de disminuir el consumo de MS y poder llegar a causar PEM, el S interfiere en la disponibilidad de Cu y Se para el animal. Las BRS asimiladoras, reducen el sulfato a H₂S el cual es utilizado para producir los aa que contienen azufre, a diferencia de las BRS desasimiladoras donde el H₂S es el final del metabolismo (Bradley *et al.*, 2011). Las bacterias desasimiladoras de sulfatos utilizan el camino de la respiración anaeróbica para procesos energéticos. Algunas BRS pueden también reducir otros compuestos de azufre, aumentando la concentración en rumen. Actualmente la genómica ha permitido el estudio de las BRS identificando como géneros principales *Desulfovibrio*, *Desulfohalobium* y *Sulfolobus*, también se demostró el pico de producción 15 días pos ingesta. Cummings y otros (1995), experimentando con aislados de microbios de animales sometidos a dietas altas en S, encontraron, después de 10 días, mayor capacidad de generar H₂S, manteniendo la población constante, siendo capaces las BRS de utilizar otras fuentes de electrones como lactato o fumarato. Drewnoski y otros (2014), observaron a través de metagenómica, correlación directa entre el número de BRS y el contenido de S en la dieta. Jeffrey y compañía (1994), sugieren como normal un valor medio de 450 ppm de H₂S, la concentración de los gases en el rumen es dinámica y cambia en función del alimento consumido, por lo que la información basada en un grupo puede no representar el valor individual de un animal. Además los niveles de toxicidad son confusos, Zinn y col. (1997) encontraron daños cerebrales con concentración S de 0.25% en dietas, y Willms (2002) una disminución de la

performance en animales de feedlot que consumían agua con 2500 ppm de sulfatos en agua, lo que representan menores valores límites que los que se toma de referencia actualmente (0,4% NRC, 2001).

6.1.2.2 INTOXICACIÓN POR COMPUESTOS NITROGENADOS

Para analizar este problema es necesario recordar el ciclo del Nitrógeno en la naturaleza. En forma general, los animales necesitan nitrógeno para la síntesis de proteínas, ácidos nucleicos y otras moléculas. Al no tener la capacidad de obtenerlo directamente de la atmósfera, donde se acumula, lo debe incorporar a través del alimento vegetal. Los contenidos de nitratos y nitritos en plantas varían acorde con la condición fisiológica, pero también dependiendo del contenido de nitratos en el suelo, que a su vez dependerá de la cantidad y tipo de bacterias asimiladoras y condiciones del suelo. Al igual que el azufre, los nitratos en el agua son complementarios a los nitratos en los alimentos. La contaminación del agua por nitritos y nitratos puede resultar en mortalidad y/o abortos en el caso de animales preñados. Debido a que los nitratos son compuestos solubles, se pueden mover fácilmente a través de suelos percolados, napas, o aguas superficiales. Por lo general la intoxicación ocurre con mayor frecuencia en suelos con alto contenido de materia orgánica, praderas de leguminosas o ingestión de agua conteniendo altos niveles de nitratos. En dietas de alta inclusión de GF, existe un alto riesgo de intoxicación por compuestos nitrogenados al tratarse de un concentrado proteico. Los bovinos utilizan la proteína de la dieta de una forma relativamente ineficiente debido a que la degradación microbiana en el rumen, pero ello se reinvierte si se considera que sintetizan proteína de elevado valor biológico, a través de la incorporación de aminoácidos, NH_3 o urea endógena, que de otra forma sería excretada en la orina. La proteína es, a menudo, el nutriente más limitante en la nutrición animal, siendo la urea una buena alternativa económica, presenta el inconveniente de la rápida degradación ruminal. La degradación de la urea ocurre cuatro veces más deprisa que la captación microbiana del amoníaco liberado (Bloomfield y col., 1960). Los productos nitrogenados no proteicos y una cantidad variable de la proteína verdadera son degradados hasta amoníaco en el rumen. Aproximadamente el 80 % de las especies microbianas presentes en el rumen pueden crecer con N-NH_3 como única fuente nitrogenada. Estudios *in vitro* han demostrado que el máximo crecimiento se logra cuando el nivel de amoníaco es de 5 mg/100ml, coincidente con resultados obtenidos *in*

vivo con animales en pastoreo por Santini y col. (1986). En pastos con alrededor de 12-14 % de proteína bruta los niveles de NH_3 fueron de aproximadamente 5mg/dl, a partir del cual, al aumentar la proteína de la ingesta, se produce una explosión de NH_3 en rumen, debido a la incapacidad de las bacterias por captarlo, produciendo toxicidad, manifestándose en forma severa a través de diarrea, o cuando es aguda, causa la muerte de animales. Por otro lado, las manifestaciones clínicas que ocasiona el consumo de nitrato dependerán entre otros factores del compuesto que predomine en el organismo tras su ingestión y metabolismo. En la mayoría de las ocasiones, la clínica de la intoxicación será la suma de la acción patógena de nitratos, nitritos y amoníaco. Cuando ocurre acumulación de nitrato en el rumen por falta de poder reductor para su conversión a nitrito, puede ocurrir que el exceso sea absorbido hacia sangre o eliminados vía renal, siendo el nitrato y el nitrito en exceso irritantes renales. Cuando el nitrato es arrastrado con la fase líquida ruminal en cantidad suficiente hacia tramos inferiores del tracto digestivo, provoca irritación de la mucosa (gastroenteritis), que puede derivar en diarrea, y facilita la colonización de la misma por microorganismos patógenos que pueden causar infección. Además afecta la cantidad de ácido butírico disponible para la pared ruminal al competir en la reducción con el nitrito, ocasionando parálisis ruminal y con los trastornos fisiológicos que esto conllevan. Como la conversión del nitrato a nitrito es más rápida que del nitrito a amoníaco, un déficit de poder reductor provocará una acumulación en el líquido ruminal de nitrito que pasará a la sangre. El nitrito es un compuesto metahemoglobinizante y vasodilatador periférico, ocasionando hipoxia tisular. Cuando los niveles de metahemoglobina alcanzan entre el 30 y 40%, se manifiesta debilidad, ataxia, temblores, hipersensibilidad, jadeo e incremento de la frecuencia cardíaca. En el campo lo más característico es la presencia de sangre achocolatada, y la muerte ocurre a niveles superiores al 80% de metahemoglobinemia. En lo que se refiere a NH_3 , una concentración por encima de la capacidad de utilización microbiana determinará la absorción de una elevada cantidad, que deberá ser destoxificada en el hígado por conversión a urea, con gasto energético. Además, reduce la absorción de magnesio lo que puede ocasionar hipomagnesemia. Parecer ser que, a determinados niveles de amoníaco, fósforo y con pH oscilando de 6.2 a 6.4, ocurre la formación de una sal compleja que fija magnesio. Este compuesto es insoluble por lo que evita la absorción de magnesio en intestino y ocasiona deficiencia. Por último, el proceso de síntesis de urea compite con la síntesis de glucosa endógena, afectando seriamente en condiciones fisiológicas elevadas.

6.1.2.3. NEUMONÍA INTERSTICIAL ATÍPICA (NIA)

La NIA es una enfermedad respiratoria aguda no contagiosa, considerada también metabólica por originarse de un desbalance proteico a nivel ruminal. El alto contenido de L-triptofano de pasturas en activo crecimiento, es degradado por los microorganismos ruminales (*Lactobacillus spp*), transformándolo en indolacético y luego convertido en 3-metilindol (3-MI). Este último metabolito llega al pulmón vía sanguínea por absorción, a nivel de rumen, a nivel de intestino delgado, y por vía respiratoria cuando los gases expulsados por eructación. La conversión de 3-MI a metabolito tóxico 3-metilindolenina (3-MEIN) se produce al llegar a los pulmones por acción de la enzima oxidasa mixta (OFM) y prostaglandina H sintetasa que se encuentran en el retículo endoplásmico liso de los neumocitos tipo I y células epiteliales bronquiales no ciliadas (Hammond *et al.*, 1979). Los animales más afectados por esta patología (edema y enfisema pulmonar) se encuentran en el período final de su terminación y son principalmente vaquillonas (3:1). De acuerdo a la epidemiología tienen en plasma el doble de concentración de 3-MI que otros animales con problemas respiratorios, sin embargo, este nivel está influenciado por una interacción compleja de factores, dentro de los cuales podemos mencionar la alimentación recibida, composición del alimento, la individualidad en la fisiología animal y posibles disparadores medioambientales como temperatura elevada y días secos. A la necropsia se observa pH ruminal más elevado y mayor amoníaco que si se los compara con animales muertos por otra causa (Ayroud *et al.*, 2000). Esto podría relacionarse con la alteración en el metabolismo proteico, presentando una disminución de las bacterias celulíticas (Doster, 2010). Se han registrados variable respuestas al agregado de aditivos. Por lo general, con monensina, debido a inhibición de *Lactobacillus*, el impacto de la enfermedad es menor, a diferencia del acetato de melengestrol por aumento de enzimas prostaglandina H sintetasa y citocromo p450, que favorecen la conversión de 3-MI en 3-MEIN (Stanford *et al.*, 2006). El acetato de melengestrol al ser usado en hembras para suprimir el celo, explicaría el mayor porcentaje que se observa en hembras. La morbilidad de la enfermedad es muy variable (con 50% de letalidad), y va a depender de la estación del año, del sexo, de la alimentación. La inhalación experimental de dióxido de nitrógeno produce cuadros similares a NIA (Blood, 1992), por ello, y sumándole las cuantiosas pérdidas económicas en los sistemas por ser enfermedades de difícil determinación, se debe incluir como diagnóstico diferencial. Valles (2010), propone la evaluación NH₃ y

H₂S ruminales como posibles indicadores de NIA, sin embargo, debido a la inconsistencia de las mediciones de NH₃, y de acuerdo a su correlación directa, reemplazó con datos de pH, este gas. Los resultados experimentales determinaron diferencias entre animales afectados y control con los siguientes valores in vivo: H₂S 136 ± 133.3 ppm y pH 6.4 ± 0.5; y para grupo control: H₂S 269.8 ± 311.6 ppm y pH 6.2 ± 0.6. Si bien no encontró diferencia significativa, la tendencia fue la misma. No existe un tratamiento eficaz de esta enfermedad, debido a la naturaleza aguda y al carácter irreversible de la lesión alveolar, la mejor opción es la prevención (Stanford *et al.*, 2006). Para ello se debe evitar los cambios bruscos de los componentes de la ración y que la homogeneidad sea constante, evitar el molido de granos (disminuiremos el polvo), el uso de cereales residuales de los pisos de silos, y en vaquillonas el acetato de melengestrol. Algunos trabajos recomiendan suplementos con vitamina E o el uso de harina de plumas, intentado bloquear la conversión del 3-MI. A pesar de las cuantiosas pérdidas económicas que produce principalmente en el ganado bovino de carne, hasta el presente se le ha prestado poca atención

6.1.2.4. ACIDOSIS

La tendencia mundial al incremento en la productividad de los sistemas ganaderos, ha generado la utilización de altas cantidades de concentrado o cereales en las dietas alimenticias. A nivel de rumen estos producen cambios bioquímicos reflejándose en una baja del pH. Mendel en 1961, propuso este parámetro como indicador de la salud del proceso digestivo, determinado por la cantidad de hidrógenos (H₂) existentes en el medio. Los rumiantes buscan balancear, a través de secreción de la saliva que es alcalina, la acidez producida por los ácidos digestivos, manteniendo el pH del rumen cerca de la neutralidad (Wattiaux, 2000). Una de las causas del descenso del pH ruminal son los carbohidratos, que como ya se ha dicho, constituyen la mayor parte de la ración alimenticia bovina, generando como producto final de su utilización, los ácidos grasos volátiles (AGV). La cantidad de AGV producidos en el rumen depende de la cantidad de ración ingerida y de la velocidad de degradación (Sauvant *et al.*, 1999). Por lo general, en dietas con alta tasa de pasaje, los animales ingieren mayor cantidad, lo que generaría mayor producción de ácidos y por ende descenso de pH. Cuando el valor de pH es inferior a 5.8 se produce acidosis ruminal. Esta enfermedad afecta el bienestar animal y por ende, la producción y economía del sistema productivo. La

acidosis incluye 3 tipos, crónica, sub-aguda y aguda. En la primera no se observa efecto clínico sobre la performance animal, sin embargo, el impacto económico podría ser mayor que el causado por la aguda (Britton y Stock, 1989). La aguda es provocada por un excesivo consumo de carbohidratos rápidamente fermentables, lo que resultará en una repentina baja en el pH ruminal y aumento en la concentración de ácido láctico, siendo más sensibles aquellos animales que no han desarrollado una población adecuada de microorganismos que utilicen el láctico. La acidosis ruminal subaguda conocida como SARA (por sus siglas en inglés), se presenta en periodos de depresiones moderadas del pH ruminal (5-5.8) con una duración entre aguda y crónica. El ácido láctico no se acumula consistentemente en los fluidos ruminales; la depresión en el pH ruminal del ganado con SARA se debe a la acumulación de ácidos grasos volátiles (AGV) totales y no a la acumulación de ácido láctico. La dinámica del pH en el rumen genera confusiones para diagnosticar la enfermedad, debiéndose considerar además, tiempo y causa. Investigaciones muestran que una acumulación de ácidos láctico en rumen, disminuye la actividad de los microbios (Nagaraja y Titgemeyer, 2007), no llegando a niveles tóxicos cuando existe un activo metabolismo de las bacterias lácticas. La eficiencia del sistema digestivo bovino depende indirectamente de un rango de pH (entre 5.5 y 6.5), lo que permite un adecuado funcionamiento de los microorganismos encargados de la fermentación. Varias de las características de la dieta pueden afectar el valor de pH, razón por lo cual, es habitual realizar mediciones de pH ruminal. A un pH de 5 desaparece la flora Gram (-) al igual que los protozoarios, aumenta la presión osmótica por lo que el organismo cede agua hacia el interior del rumen, por ello el contenido ruminal se torna más líquido y se produce una hemoconcentración, deshidratación de moderada a severa, que puede llegar hasta oliguria o anuria. En la sangre cambian sus componentes aumentando el piruvato, lactato y glucosa, produciendo una acidosis metabólica. Debido a la muerte de bacterias Gram (-) se produce la liberación de endotoxinas, provocando una endotoxemia y daños en diferentes órganos parenquimatosos, aumentando la concentración de histamina (el aumento en sangre es la causa de la laminitis), triptamina y tiramina. Dentro de las alteraciones locales se produce una reticulorumenitis que afecta principalmente al saco ventral del rumen. Esto es atribuido al efecto cáustico del ácido láctico. Además se produce edematización de la submucosa con desprendimiento de grandes áreas de la mucosa, observándose paraqueratosis y posteriormente ulceración del epitelio ruminal. En resumen la patogenia se da con el aumento brusco de la ingesta de carbohidratos de

fácil digestión, en rumen se sintetizan AGV y ácido láctico, y simultáneamente se modifica la flora y fauna ruminal, proliferando las bacterias Gram (+) en desmedro de las Gram (-). La enfermedad tiene varias consecuencias, además de predisponer a tener otras patologías por el desequilibrio metabólico que puede provocar, uno de los signos que primero se observan en tambo es la disminución en la grasa de la leche en comparación de la medición anterior. Este problema parece estar relacionado con las dietas ricas en almidones, lo cual provoca una mayor producción de ácido propiónico, disminuyendo la producción de ácido acético (precursor de la grasa en leche). La elevada concentración de ácido láctico en el rumen causa una rumenitis química, que es la antecesora de la rumenitis micótica (*Mucor*, *Rhizopus* y *Absidia*) provocando trombosis en los vasos ruminales. Posteriormente se produce necrosis difusa y gangrena llegando a desarrollarse una peritonitis aguda. Además, debido a las lesiones en la mucosa ruminal es frecuente encontrar que los animales presentan indigestión simple. Los tampones ruminales son sustancias que evitan la excesiva acidificación del rumen cuando se utilizan raciones con mucho concentrado, siendo las más utilizadas óxido de magnesio al 0.5%, bicarbonato sódico al 1.0 o 1.5%, sexquicarbonato de sodio entre 1.5 y 2.0%, como también las combinaciones entre ellos (2/3 de bicarbonato con 1/3 de óxido de magnesio). Sobre la base que la acidosis es una enfermedad que se inicia y radica a nivel ruminal, sería adecuada la evaluación dicho órgano. La toma de muestras del contenido ruminal puede ser realizado por sondaje o punción. El empleo de sondas protegidas por cubiertas metálicas y de introducción oral es el método tradicional de obtener muestras del rumen. Mediante el mismo se pueden conseguir con facilidad volúmenes importantes de líquido sin crear ningún trastorno para el animal. Sin embargo, el sondaje tiene como inconveniente la alta contaminación salival con el consiguiente error en la determinación del verdadero pH. La punción ruminal, llamada ruminocentesis, consiste en tomar muestras a través de las paredes del rumen mediante aguja y jeringa. La técnica es simple, no suele ofrecer complicaciones y está exenta del efecto de la saliva, pero tiene la limitante del escaso volumen que suele extraerse, además del sometimiento al animal. Actualmente, para cubrir los altos requerimientos de nutrientes necesarios para la producción intensiva, las dietas incorporan altos niveles de concentrados a costa de la reducción de los ingredientes de menor calidad, en general los forrajes, que son los más aptos para el buen funcionamiento ruminal. Buscando disminuir el riesgo de pH ruminales inadecuados, se utilizan aditivos buffer, aunque la inclusión en la dieta suele ser en cantidades pequeñas, repercute en un 3-15% de los

costes de alimentación, y en función a la amplia gama de los mismos, se planteó evaluar los efectos de nuevas alternativas como aditivos contra la acidosis ruminal.

Como segundo objetivo del capítulo se propone, comparar distintos compuestos adicionados a una ración altamente fermentecible, a través del monitoreo por microfistula del pH ruminal, buscando diagnosticar trastornos metabólicos subclínicos en el estado inicial antes de la disminución de la producción, problemas reproductivos y manifestación clínica de las enfermedades.

6.2 MATERIALES Y MÉTODOS

Los ensayos se realizaron en el INTA, Estación Experimental San Luis (Latitud 33°39'50" S, Longitud 65°24'37" W), durante el periodo 2011, 2012 y 2013.

La muestra utilizada en la evaluación de inóculos fue heno de alfalfa, *Medicago sativa* L, con 35 días de rebrote. La misma se secó a 65°C por 48 h, continuando con un molido y tamizado (2mm), para posterior determinación analíticas de materia seca (AOAC, 1990), proteína bruta por Kjeldahl, en forma secuencial, fibra detergente neutra (FDN), fibra detergente ácida (FDA) y lignina detergente ácida (LDA) (Goering y Van Soest, 1970), cuyos resultados se muestran en la Tabla XXI. Para el análisis de digestibilidad verdadera *in vitro*, se utilizó la técnica descrita por Goering y Van Soest (1979), adaptando la modificación metodológica propuesta por Ankom Technology Corporation, para el equipo DaisyII® (Fig.33). Para ello se depositaron 250 mg de muestra en bolsas de poliéster/polietileno (FN° 57), con dimensiones de 5 x 4 cm y porosidad de 25 µm, las mismas se sellaron con calor, colocándolas en recipientes de vidrio (jarras) de 4 litros de capacidad, que giran dentro de una cámara a temperatura controlada. En cada una de las cuatro jarras de digestión se incubaron al azar 10 bolsas (repeticiones), incluyendo dos blanco (bolsa vacía y sellada sin muestra), con el fin de generar el factor de corrección por el posible ingreso de partículas ó pérdida de peso de las bolsas. La solución buffer que se añadió en cada recipiente fue la propuesta por Kansas State (Marten et al., 1980) compuestas por minerales, fuentes de nitrógeno y agentes reductores que ayudan a la anaerobiosis necesaria en el proceso. El inóculo microbial necesario para el procedimiento se recolectó de un bovino macho de raza Aberdeen Angus con fístula en rumen, de peso vivo 350 kg, alimentado en el primer periodo del ensayo con heno de alfalfa, y en una segunda etapa con rollo de digitaria,

de baja calidad con la finalidad de evaluar la interacción entre el sustrato, el inóculo y la digestibilidad. El material ruminal se extrajo directamente a través de la fístula ruminal, se tomó un puñado de mezcla del rumen, se exprimió el contenido para extraer el líquido y éste se almacenó en los termos previamente calentados con agua a 40°C para su transporte. En el laboratorio el material ruminal se licuó por 30 segundos, se filtró y transfirió a un erlenmeyer mantenido en baño maría a 39°C, continuamente saturado con CO₂. La materia fecal se obtuvo del mismo animal, simultáneamente a través de palpación rectal, manteniendo el material en bolsas de polietileno herméticamente cerradas y en conservadora a 40°C hasta su procesamiento. Para la homogenización del inóculo fecal, se mezcló 40 gr. de heces con 360 ml de agua destilada con gaseado constante con CO₂, luego se filtró la solución obtenida a través de una doble capa de gasas y se agregó a dos de las jarra de incubación. En laboratorio, a la preparación de la solución tampón (1600 ml/jarra) se adicionó 400 ml de líquido ruminal o fecal, en condiciones anaerobias permanentes. Las muestras se incubaron por 48 h en el DaisyII® a una temperatura de 39.2 ± 0.5°C, con agitación circular constante que posee el equipo. Luego de la incubación, las bolsas se lavaron con agua fría, con el fin de detener la fermentación y se procesaron en el analizador de fibra Ankom 220, sometiendo los residuos de la incubación a una solución detergente neutra por una hora a 100°C, permitiendo remover restos microbianos y algunos remanentes de fracciones solubles para obtener resultados en términos de digestibilidad verdadera *in vitro* de la materia seca (DVIVMS). En cada periodo experimental se realizaron dos series de incubaciones separadas por un intervalo de dos días.

Tabla XXI: Composición química de Heno de Alfalfa (muestra) en base a MS

MS %	FDN %	FDA %	PB %	DVIVMS %	DIVMS %	EM ¹ Mcal/kgMS	EM ² Mcal/kgMS	EM ³ Mcal/kgMS
94,98	49,72	30,10	14,71	76,80	64,90	2,35	2,77	2,34
MS: Materia Seca. PB: Proteína Bruta. FDN: Fibra Detergente Neutro. FDA: Fibra Detergente Ácida. LDA: Lignina detergente Acido. DVIVMS: Digestibilidad Verdadera <i>in vitro</i> de la materia Seca. DIVMS: Digestibilidad <i>in vitro</i> de la materia Seca. EM: Energía Metabólica estimada a partir de: 1- FDA, 2- DVIVMS, 3- DIVMS.								

Para evaluar la capacidad amortiguadora de aditivos no convencionales en ganado de carne, se efectuaron análisis *in vitro* e *in vivo*. La evaluación *in vitro* se realiza mediante ensayos comparativos en incubador DaisyII®. El sustrato de fermentación empleado es una mezcla comercial peletizada constituida por ración base (RB) en partes iguales de afrechillo de trigo, grano de maíz molido y harina zootécnica.

La harina zootécnica es un subproducto obtenido de la molienda seca de maíz, parcialmente húmeda, compuesta de germen, salvado, harinas y trozos provenientes de la molienda del grano de maíz. A la RB se le incorporan al 1% los diferentes aditivos, conformando los pellets que se entregan en cada tratamiento

R1= Ración base +Bentonita

R2= Ración base + Bicarbonato sódico (NaHCO_3)

R3= Ración base + Diatomea

R4= Ración base + Aluminosilicato

R5= Ración base(placebo)

En el análisis *in vitro*, a cada jarra, se le agregan 6 g de pellet (la ración base con aditivo), más 400 ml de inóculo ruminal y 1600 ml saliva artificial (Kansas State). El inóculo microbial se recolectó de un bovino macho de raza Aberdeen Angus fistulado en rumen, con peso vivo de 350 kg, alimentado con heno de alfalfa (*Medicago sativa*) de buena calidad (10% floración). La colecta del inóculo se extrae directamente a través de la fístula ruminal y se almacena en los termos previamente calentados con agua a 40°C para su transporte al laboratorio. Allí, la parte sólida se licua por 30 segundos, se filtra y transfiere a un erlenmeyer mantenido en baño maría a 39°C continuamente saturado con CO_2 . Este procedimiento se realiza para garantizar que el inóculo resultante estuviera compuesto por microorganismos ruminales adheridos y no adheridos a la fibra. Luego del filtrado del líquido ruminal se mezcla con solución de Kansas, en proporción 1:4 (v:v). En cada tanda de incubación se corrieron las 4 jarras. Se midió pH en base al método potenciométrico descrito por Sierra y Morante (2007) con un potenciómetro digital Denver Inst. Up 10, provisto de un electrodo de vidrio. Se ajustó el potenciómetro a $20 \pm 1^\circ\text{C}$, y se realizaron lecturas por duplicado sobre las muestras homogeneizadas de cada jarra cada 30 minutos durante las primeras horas de incubación y al día siguiente para completar las 22 h. Las comparaciones se establecieron, por corrida, realizando 3 repeticiones por tratamiento.

FIGURA 33: Incubador Daisy II (Tecnología Ankom)



La técnica *in vivo* con microfistulas se realizó a cinco bovinos A. Angus de 30 meses de edad, previamente amansados. En las determinaciones de pH, se aplica el mismo protocolo de la técnica desarrollada en Cap. 3. Una vez ingresado el animal al cepo, de la porción externa de la cánula se extrae por succión 20 ml de líquido ruminal, a través de una sonda que ingresa por microfistula al rumen. Inmediatamente se determina pH, con leve modificación del ambiente ruminal (Fig.34). Cada uno se alimentó con las dietas de los 5 tratamientos mencionados a razón de 6 kg de pellets de ración base y 2 kg de silaje de sorgo (tal cual). Esta dieta se entregó dos veces por día (8.30hs y 14.30 hs). Se determinó el pH del líquido ruminal con potenciómetro digital previo a la primera comida, y cada hora después de haber consumido el concentrado. Las mediciones se realizaron por 3 mañanas consecutivas obteniendo valores promedios, excepto último día que también se realizaron después de la segunda comida.

FIGURA 34: Obtención y lectura de pH del líquido ruminal.



6.2.1 ANALISIS ESTADISTICO

El ensayo de comparación de inóculos se realizó en dos periodos de 20 días de duración cada uno determinados por la ración del animal donante. El diseño

experimental fue en bloques (jarras) con 10 repeticiones en cada bloque. Por tanta se corren cuatro jarras, dos con fluido ruminal y las otras dos con fluido fecal. Los resultados fueron analizados mediante estadísticas descriptivas, las relaciones entre la DVIVMS usando inóculos ruminales y fecales se estudiaron mediante análisis de correlación del paquete estadístico de IBM SPSS (2010).

El diseño del experimento *in vitro* para la medición de pH en función a los diferentes aditivos, fue completamente aleatorizado, aplicando cada aditivo a una jarra independientemente de las demás. Los cinco tratamientos se asignan al azar en cada corrida, por triplicado. Los resultados obtenidos se sometieron a un análisis de varianza utilizando el procedimiento de Anova y comparación de medias mediante el test de Tukey. A campo, se aplicó un diseño experimental de bloques completamente aleatorizado, considerando a cada animal como unidades experimentales y la bloquización en función al tiempo, buscando reducir y controlar la varianza del error experimental con el fin de lograr una mayor precisión. El diseño de los tratamientos, que es independiente del diseño experimental fue un arreglo factorial (5x6), con dos factores de interacción, aditivo y tiempo. A ambos tipos de diseño le corresponde un modelo matemático de diseño al azar en bloque (Ec. 10). Por otro lado, los tratamientos se forman combinando niveles de factores de estudio determinando el modelo factorial de acuerdo a la ecuación 14

$$T_i = \alpha k + \gamma l + \epsilon kl$$

Ecuación 14

T_i = tratamiento,

αk = factor aditivo (k=Bentonita, Bicarbonato sódico, Diatomea, Aluminosilicato, placebo)

γl = factor tiempo (l= pre-aliment, 2h (1^a), 4h (1^a), 2h (2^a), 3h (2^a), 4h (2^a))

ϵkl = interacción factor aditivo, tiempo.

Los resultados de la evaluación a campo, se sometieron a un análisis comparación mediante variable dummy, debido a factoriales desbalanceados.

6.3 RESULTADOS

En lo referido al primer objetivo, la DVIVMS con ambos inóculos se ve afectada por dieta del animal donante, manteniéndose en las corridas el ranking de los valores de superioridad del inóculo ruminal (Tabla XXII).

Tabla XXII: Estadística descriptiva de la DVIVMS de alfalfa

Inoculo	Dieta	Media	DE	EE	Var.	CV	Intervalo de confianza 95%	
LR	alfalfa	76,79	1,41	0,22	1,93	1,83	76,93	77,22
LF	alfalfa	73,83	1,21	0,19	1,43	1,64	73,45	74,24
LR	digitaria	74,73	0,94	0,15	0,88	1,25	74,45	75,03
LF	digitaria	70,43	1,64	0,26	2,70	2,33	69,97	70,95

DE: desvío estándar. EE: error estándar. Var: varianza. CV: coeficiente de variación. LR: licor Ruminal. LF: licor Fecal

Para corroborar si había diferencia significativa, se analizan los datos estadísticamente; encontrando que los valores no se distribuyen normalmente como indica la Tabla XXIII.

Tabla XXIII: Prueba de la normalidad

Inóculo	Dieta	Shapiro-Wilk Sig.	Homog.Vza E. Levene
Licor Ruminal	Alfalfa	0.047	7.37
	Digitaria	0.003	
Licor Fecal	Alfalfa	0.017	1.58
	Digitaria	0.003	

p>0.05, acepto la H0= distribución normal

La Prueba de Shapiro-Wilk muestra claramente que los datos no son normales, además la prueba de homogeneidad de la varianza con el estadístico de Levene, nos indica que las varianzas no son iguales ni homogéneas, por lo cual, se aplicó el Tets de Mann Whitney (Tabla XXIV), existiendo diferencias altamente significativa entre las dietas para licor ruminal y para licor fecal dando un p-valor=0, dando los mayores resultados de digestibilidad con licor ruminal a partir del animal alimentado con alfalfa.

Tabla XXIV: Análisis No Paramétrico: Prueba de Mann-Whitney

Estadís.Cont.: Dieta	LR	LF
U de Mann-Whitney	176.000	110.000
W de Wilcoxon	996.000	930.000
Z	-6.006	-6.640
Sig. Asint.	.000	.000

En la Tabla XXV se muestra la comparación entre medias de pH *in vitro* de los resultados del ensayo con aditivos no convencionales

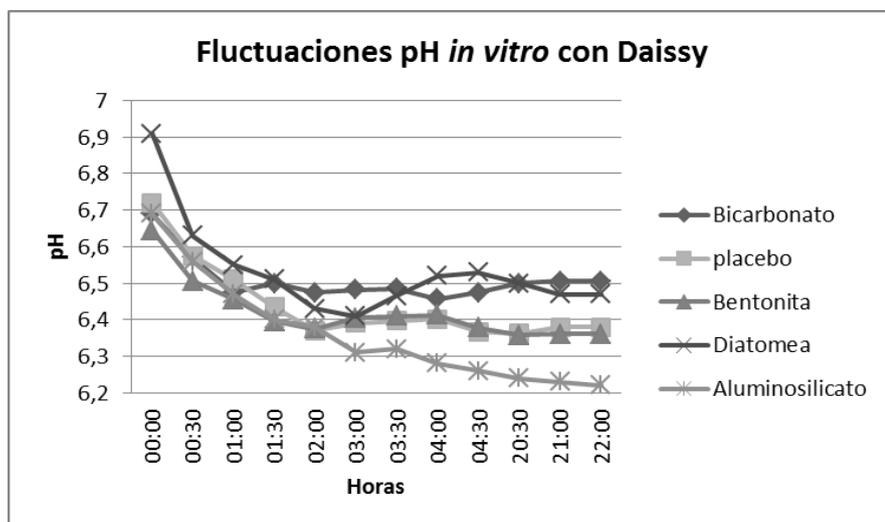
Tabla XXV: Medias de pH *in vitro* en un período de 22 h de fermentación.

Tratamiento	pH	p-valor
R1	6.42	A B
R2	6.51	A
R3	6.53	A
R4	6.39	B
R5	6.44	A B

Letra distinta indica diferencia significativa ($p < 0,05$)

Las curvas de la Figura 35, muestran que el bicarbonato de sodio es el que presenta mayor estabilidad en el tiempo, mostrando menor pendiente en las primeras 2 horas de incubación a partir de la cual se estabiliza en un pH 6,65 (+/- 0,05). Los tratamientos R1 (Bentonita) y R3 (Diatomea), disminuyen rápidamente llegando a un pH 6,4 (+/- 0,05) a partir del cual aparecen marcadas fluctuaciones. La R4 (aluminosalicato), si bien no genera una pendiente pronunciada, su tendencia es negativa en todo el ensayo, siendo la de menor valor de pH, a partir de la tercera hora y en adelante. No existen diferencias significativas entre R3 y R2; R5 y R1.

FIGURA 35: Evaluación de pH *in vitro* en raciones con distintos aditivos



A través de licor ruminal obtenido por microfístula en diferentes momentos del día, se obtienen los pH ruminales que se presentan en la Tabla XXVI. Los resultados presentan una distribución normal (Shapiro-Wolk $p = 0.09337$), y homogeneidad en la varianza (Test de Bartlett, $p = 0.4468$ (horas) y $p = 0.3482$ (aditivos)).

Tabla XXVI: Medias diurnas del pH ruminal de animales alimentados con ración altamente fermentescible con diferentes aditivos.

Tiempo	R1 Bentonita	R2 Bicarbonato	R3 Diatomea	R4 Aluminosil.	R5 Placebo
Pre-al	6,69 (0,32)	6,81 (0,25)	6,77(0,24)	6,52(0,36)	7,05(0,16)
2h (1^a)	5,78 (0,38)	5,76 (0,36)	5,43(0,10)	5,71(0,29)	5,64(0,31)
4h (1^a)	5,62 (0,22)	5,72 (0,29)	5,33(0,30)	5,5(0,23)	5,81(0,32)
2h (2^a)	5,41 (0,10)	5,31 (0,01)	5,44(0,45)	5,04(0,01)	4,98(0,07)
3h (2^a)	5,41 (0,15)	5,41 (0,16)	5,08(0,00)	4,92(0,02)	5,07(0,01)
4h (2^a)	S/D	5,59 (0,10)	5,67(0,00)	4,83(0,00)	5,02(0,00)

(1^a) primera entrega de alimento. (2^a) segunda entrega de alimento. (...)Desvío estándar

En la Figura 36 se relacionan los resultados con la media total del experimento. El bloque hace referencia a las horas pos-alimentación en el día, los valores de AM indican las mediciones realizadas luego de la primera entrega de alimento, mientras que PM, las mediciones realizadas a posterior de segunda entrega del alimento. Los tratamientos muestran el comportamiento de los diferentes aditivos a la ración base.

El análisis de anova indica diferencias significativas en los bloques ($p=0.0047$), pero no los tratamientos ($p=0.0731$) al 95% de confianza. En el estudio de los bloques las diferencias entre los tratamientos se dan entre 2PM-2AM, 3PM-2AM y 4AM-3PM, como se muestra en la Figura 37.

FIGURA 36: pH y horas de medición en relación a la media general del ensayo.

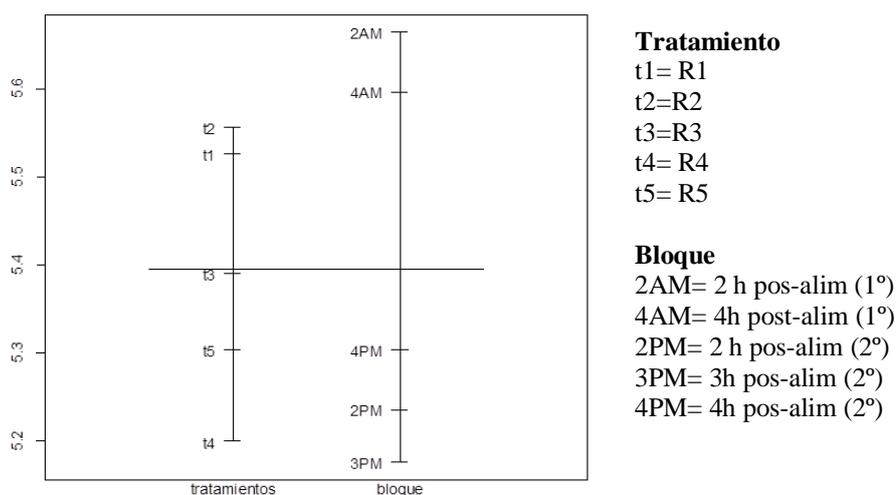
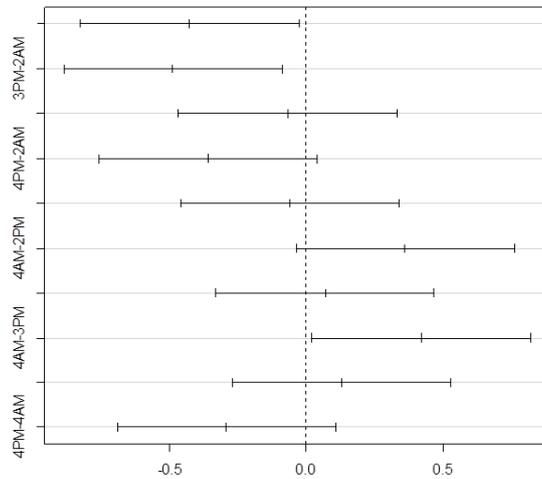


FIGURA 37: Diferencias del pH ruminal entre las distintas horas de día



Para evaluar la capacidad amortiguadora de tres aditivos no convencionales en relación Bicarbonato sódico (HCO_3Na), por ser el usado como referente en nuestros sistemas productivos, surge la necesidad de estudiar conjuntamente el pH y tiempo. Debido a que el número de observaciones en cada tratamiento es diferente, no se pueden aplicar técnicas de anova usual, al ser diseños factoriales desbalanceados, la ortogonalidad entre efectos principales e interacciones ya no funciona, por esta razón se realiza un análisis de regresión con variables dummy, a través de la comparación de las curvas de pH, obteniendo los resultados de la Tabla XXVII.

Tabla XXVII: Análisis comparativo entre la curva de pH del HCO₃Na y otros aditivos.

V. Dummy	p-valor
Modelo	<0,0001
tiempocod	<0,0001
Dieta_1,00	0,6698
Dieta_3,00	0,3976
Dieta_4,00	0,3484
Dieta_5,00	0,0972
Dieta_1,00_tiempocod	0,9812
Dieta_3,00_tiempocod	0,5815
Dieta_4,00_tiempocod	0,7465
Dieta_5,00_tiempocod	0,03
Significativamente diferentes (p<= 0,05)	
Tratamiento de Referencia: HCO ₃ Na	

El análisis con variables dummy determina diferencia significativa solo en R5, que corresponde al placebo.

6.4 DISCUSIÓN

Las diferencias obtenidas en el ensayo de comparación de inóculos, entre las dietas del animal donante, podría deberse al efecto que el alimento tiene sobre algún tipo de bacterias del rumen, como se observa en alfalfa, que al favorecer el desarrollo de la flora proteolítica, aumenta la digestibilidad de la muestra muestra por su alto contenido de proteína bruta. Ørskov, en varios de sus trabajos (1970, 1972), demostró que realizando infusiones al abomaso con distintos tipos de carbohidratos, no varía la microflora cecal en lo que se refiere a las especies, pero sí en concentración. En general la DVIVMS usando fluido ruminal resultó ser, en promedio, 4 puntos mayor que en el caso del fluido fecal, lo cual puede deberse a una menor concentración microbiana, y además, a la pobre población desarrollada en heces, en comparación al ambiente ruminal, por la variada oferta de nutrientes que éste recibe. Esta menor digestibilidad del fluido fecal coincide con lo señalado por El Shaer y colaboradores en 1987 al evaluar varios sustratos, donde obtuvieron un menor valor con fluido fecal de ovejas comparando digestibilidad *in vivo*, atribuyendo ésto a factores propios de la técnica, como son humedad de las heces y tiempo de incubación; razón por la cual para disminuir estos errores, se realizaron las determinaciones en simultaneo, y en función de

la humedad de las heces se estimó la proporción para la preparación de los licores microbiales. Omed en 2000 reportó que la relación entre la DIVMS y la concentración de heces en el inóculo no es lineal, y que concentraciones muy altas resultan en valores bajos de DIVMS, encontrando la mayor actividad de las heces cuando se utilizan entre 6-10 gr de heces/100 ml de solución de saliva artificial. La similar y en algunos casos menor desviación estándar asociadas con fluido fecal, indicarían que la modificación del inóculo en el método tradicional tendría menor precisión, sugiriendo esto que podría ser usado para predecir la digestibilidad verdadera con una variación relativamente baja. Coincidiendo con varios autores (Jaakola y Huhtanen, 1993; Ramanzin *et al.*, 1997; Kawas *et al.*, 1991) quienes evaluaron el efecto de la dieta del animal donante sobre el licor ruminal, se concluye que la dieta es el factor principal de variación de la técnica *in vitro*, por la modificación cuantitativa y cualitativa de la microflora ruminal. Aiple (1992), afirma que la actividad del inóculo fecal depende de la población microbiana del intestino posterior y éste a su vez de la dieta. Esto se evidencia con el bajo factor de relación del 45,6% obtenido en el análisis estadístico al tratar de relacionar los valores de digestibilidad sin estratificar por dieta e inóculo (Ecuación 15), sin embargo, al comparar la digestibilidad con los distintos inóculos manteniendo la misma dieta, este factor aumenta considerablemente (Ecuación 16 para digitaría y Ecuación 17 con alfalfa), obteniendo el mayor valor R² para el animal alimentado con alfalfa, confirmando el efecto de la dieta sobre los inóculos. No obstante, dado el limitado número de repeticiones, y al tratarse de una misma muestra no se puede establecer alguna ecuación de predicción.

$$DIVMS(LR) = 65.573 + 0.172 * DIVMS(LF) - 1.474 * Dieta$$

R² 45.6%

Ecuación 15

$$DIVMS(LR) = 76.791 - 2.965 * DIVMS(LF)$$

R² 56.6%

Ecuación 16

$$DIVMS(LR) = 74.734 - 4.3 * DIVMS(LF)$$

R² 72.6

Ecuación 17

Donde en las ecuaciones 15, 16 y 17, DIVMS (LR) representa la Digestibilidad *in vitro* de la MS con inóculo Ruminal, la DIVMS (LF), la Digestibilidad *in vitro* de la

MS con inóculo Fecal; y en la ecuac. 15, donde dice DIETA corresponde 1, si es con alfalfa, y 2 con digitaria.

Para el segundo objetivo del capítulo, considerando el efecto de la salud en el bienestar animal, la selección de posibles candidatos que actuarían como buffers, se realizó mediante ensayos comparativos, basados en pruebas *in vitro* en incubador DaisyII®-Ankom Technology, considerándola de fácil interpretación y apropiada para probar un amplio número de sustancias en un corto espacio de tiempo para realizar las experiencias en vivo. Por cuestiones de practicidad, se muestran las evaluaciones de los aditivos que mejores respondieron y a posteriori se ensayaron a campo. Al analizar los valores medios observados *in vivo* de los tratamientos en las diferentes horas, se evidencia que el mayor efecto buffer lo tendría el R2 que corresponde al bicarbonato de sodio, seguido por el R1 que corresponde a la adición de bentonita. Cuando se observan los valores en función del tiempo, los mayores pH se obtienen a las primeras horas de la mañana, que se debería al efecto alcalinizante de la saliva, toda la noche y al ayuno, ya que inmediatamente se alimenta el mismo comienza a descender bruscamente. Los datos observados del pH ruminal son normales (Shapiro-Wilk $p= 0.09337$) y se cumple la homogeneidad de la varianza (Test de Bartlett) en las diferentes horas de medición (bloque $p= 0.4468$), y aditivos (tratamientos $p= 0.3482$). Los animales del R3, presentaron cuadro de acidosis subclínica, con síntomas de abstinencia (2ª comida) y heces blandas, lo que explicaría la alta variabilidad del pH. La ración sin buffer (R5) mostró una marcada influencia con el metabolismo propio del rumen, inmediata baja de pH pos-comida, aumentando con la producción de saliva antes de la 2ª comida y la toma de agua en función a la elevada temperatura de los días del ensayo. Similar comportamiento presentó el Aluminosilicato (R4), lo que indicaría que no presenta efecto atenuante frente la acidez generada por los AGV en rumen. Las curvas obtenidas muestran el pH del rumen y permiten inferir el comportamiento de consumo, si bien la reducción de consumo se asocia con ganado acidótico (Stock *et al.*, 1995; Bevans *et al.*, 2005), existen en la bibliografía variados resultados. Numerosos son los factores asociados con el pH y mecanismos de consumo, el trabajo realizado por Khafipour y colaboradores (2009) evalúa la acidosis producida por grano de maíz y pellets de alfalfa, obteniendo diferentes resultados de consumo, en maíz disminución y el otro aumento. En este ensayo se observó el descenso en consumo cuando se encontraban con pH bajos, además de evidenciar el efecto de los aditivos a través de la mayor estabilidad de los patrones de fermentación en el día. Para el caso del bicarbonato de sodio, que es el

buffer de referencia, además de ser un dominante natural de la saliva, la adición a la dieta ha mostrado menor tiempo del pH por debajo de 5.8 en el día. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto la necesidad de un periodo de estabilización del pH el cual guardaría relación directa con la cantidad de alimento entregado en cada comida (fraccionando la ración con mayor porcentaje en la primera entrega), considerando la frecuencia de alimentación una herramienta para la mejora del sistema sin costo inicial de alto impacto. El estudio de Pritchard y Bruns (2003) sobre engorde intensivo, el aumento de frecuencia en la entrega de alimento (de 1 a 4 veces al día) generó aumento de consumo atribuido a una reducción de acidosis. Además, DeVrides (2005) justifica la mejora de producción debido a la reducción de la competencia social y agresión por el alimento al aumentar el número de entregas. Conocer la interacción pH y tiempo, obedece al metabolismo propio del animal, ya que la digestión, luego de ingestión de alimento, avanza en el tiempo, generando como resultantes AGV los cuales modifican el pH, por lo cual para tener conclusiones respecto a los aditivos no convencionales es más útil conocer la significancia de los factores. En líneas generales la solo mostró diferencia significativa con respecto al bicarbonato de sodio, la ración que no contenía el agregado de algún aditivo (placebo), lo que indicaría que los compuestos evaluados generaron efectos en la concentración de H⁺ del líquido ruminal, determinando la Bentonita la curva de mayor similitud con la del bicarbonato, lo que indicaría que este aditivo podría usarse en su remplazo.

6.5. CONCLUSIÓN

Si bien en los ensayos de experimentación los animales sufren un cambio del estado de confort, se propone el remplazo del licor ruminal por inóculos fecales buscando evitar grandes operaciones quirúrgicas para la fijación de fistulas, sin embargo, en nuestro segundo ensayo sobre la evaluación del pH ruminal directo en los animales, a través de la microfistula (metodología desarrollada en la EEA San Luis, Cap. 3), los animales no demostraron signos de estrés relacionado con ella. Las enfermedades del rumen, por lo general se presentan en forma subclínica, es decir, que no presentan signos clínicos, mostrando los animales buen estado de salud, sin embargo, son de gran impacto económico, directamente relacionadas con la dieta y su impacto en el ecosistema ruminal. Dado el limitado número de repeticiones parece arriesgado establecer alguna conclusión como definitiva, mostrando nuestros resultados mejor comportamiento como sustancia buffer la Bentonita y un nulo efecto, Diatomea. Es

necesario continuar con trabajos de este tipo, pero simultáneamente considerar bienestar animal, que está más allá de la falta de enfermedad solamente, abarca todo lo relativo al confort animal.

Capítulo 7:

EFECTO AMBIENTAL DE LA EMISIÓN DE GASES DE ORIGEN GANADERO

7.1 INTRODUCCIÓN

En la actualidad, el clima de la Tierra enfrenta rápidos cambios que afectan tanto la composición de la atmósfera como el balance de la radiación solar, jugando un rol principal las actividades ganaderas. Tanto los sistemas de producción extensivos como intensivos, han afectado el medio ambiente significativamente modificando los hábitats naturales (a través de la implantación de pasturas no nativas, apotreramiento, reducción de árboles, etc.), generando inestabilidad geológica y menor captación de CO₂. Basados en el análisis de ciclo de vida (LCA) se ha estimado que el sector emite 7.1GtCO₂eq. (Giga toneladas de dióxido de carbono equivalente), lo que representa el 18% de las emisiones totales antropogénicas (Steinfeld *et al.*, 2006). Este resultado está representado por 2.5 GtCO₂eq emitidos por el suelo y cambio de uso del suelo, 0.4 GtCO₂eq en la producción del alimento, 1.9GtCO₂eq a partir del metabolismo animal, 2.2GtCO₂eq del manejo de estiércol y 0.03GtCO₂eq en transporte. Los reportes de IPCC del 2007 consideran que el sector emite entre 5.1 a 6.1GtCO₂eq.año⁻¹ para el 2005. En el 2006 se conoce el informe de la Agencia de protección del Medioambiente (EPA) de la Unión Europea (EU) separando las emisiones de CH₄ entérico de 2079 y 2344 MTCO₂eq/año estimadas para 2010 y 2020 respectivamente, y las derivadas del manejo de estiércol de 470 y 523 MTCO₂eq /año. Al realizar una proyección para los años 2010 y 2020 del informe de IPCC (2007) reportan una contribución de 7.3 y 7.5 % del sector ganadero. O'Mara (2011) estimó una contribución mayor entre 8 a 11%, diferenciando los sistemas de producción, haciendo hincapié en países como Nueva Zelanda y Argentina basados en la producción sobre pasturas, los cuales la emisión de CH₄ entérico es significativamente mayor. Sin embargo, en la última década en la Argentina, y principalmente en la provincia de San Luis, el mayor desarrollo se generó en los sistemas de engorde comerciales intensivos a corral, conocidos como feedlot. Estos consisten en sitios con varios corrales provistos de agua y comederos para cientos de animales, los cuales son mantenidos por varios meses, por lo que el manejo del estiércol y desagradables olores es todo un desafío. Para el manejo de los efluentes de

estos sistemas, se busca es mantener una capa de 2.5 a 5 cm de estiércol compactado sobre el suelo mineral de los corrales, mejorando el drenaje, disminuir la infiltración y previene problemas podales relacionados directamente con el estrés animal (Miller *et al.*, 2008). Por otro lado, la dieta constituye un factor que afecta indirectamente a la contaminación del ambiente en estos sistemas intensivos, las raciones suministradas a los animales son ricas en almidón y exceden el contenido de proteínas que éstos necesitan. El remanente no asimilado por el animal retorna al suelo en heces y orina, lo que produce un efecto sobre la flora microbiana estableciendo un metabolismo aeróbico y/o anaeróbico, que dependerá de la acumulación, pérdida o persistencia del estiércol como así también de las propiedades del suelo y condiciones climáticas predominantes. La contaminación de estos sistemas ganaderos intensificados tiene origen en diversas causas: gases con efecto invernadero (GEI), amoníaco (NH_3), sulfuro de hidrógeno (SH_2), compuestos orgánicos volátiles (COV) y partículas finas en suspensión aérea (PM). Estos factores se relacionan entre sí, por ejemplo, el NH_3 y SH_2 , además del efecto toxico, su persistencia en la atmósfera contribuye a la formación de partículas en suspensión. El fósforo que es excretado por los animales, puede moverse por escurrimiento superficial hacia los cuerpos de agua, con riesgo de eutrofización de las aguas superficiales, como confirma Nelson (2012) en sus estudios. La acumulación de alimentos, estiércol en corrales y la presencia de efluentes sin tratar en lagunas, predisponen a la proliferación de insectos y roedores (Bodman y Koelsch, 1996). Los insectos (moscas, mosquitos, etc.) pueden incomodar tanto a los animales como a los humanos, o ser vectores de enfermedades migrando a las zonas periurbanas (ACFA y AAFRD, 2002).

Con respecto a los gases, un estudio realizado en Canadá sobre 18 feedlots arrojó valores entre 0.009 y 1213 ppm de amoníaco (ACFA y AAFRD 2002), el cual a partir de 20 ppm produce irritación de las mucosas, como también, al reaccionar en el aire con otros gases contribuyen a la acidificación de los suelos por precipitación (Hatch *et al.*, 2002). La emisión de amoníaco está relacionada también con el olor (McGinn *et al.*, 2006), al igual que el sulfuro de hidrógeno (Chiumenti *et al.*, 2005). En condiciones ácidas el azufre se asocia con protones para formar sulfuro de hidrógeno, un producto final común en sistemas biológicos anaeróbico, responsable de olores desagradables. Los GEI, conformados por dióxido de carbono (CO_2), óxido de nitrógeno (N_2O) y metano (CH_4); tienen la capacidad de absorber calor, siendo los responsables de alterar el equilibrio natural que existía entre la energía solar entrante y

la energía terrestre saliente, dando como resultado el aumento de la temperatura global de la tierra. El CO₂ es el gas con mayor contribución relativa al cambio climático, sin embargo el CH₄ en la atmósfera en los últimos dos siglos ha aumentado su concentración en más de 140% (IPCC, 1996). Este gas, junto a los óxidos de nitrógenos (N_xO_x) son producidos principalmente por la ganadería, cuyos precursores dependerán de la dieta animal y manejo del estiércol, mientras que la participación del dióxido de carbono aumentará en la medida que se tecnifica la producción ganadera (SAyDS, 2007). El nitrógeno (N₂) presente en las excretas animales, tiene grandes posibilidades de perderse hacia la atmósfera como NH₃, según la temperatura, contenido de humedad, pH del suelo, entre otros factores de acuerdo al trabajo de Keeney y Hatfield (2001). Los compuestos odoríferos son producidos por actividad microbiana que se encuentran en la superficie de los suelos, utilizando el sustrato encontrado en el estiércol, siendo las enzimas ureasas responsables de la conversión de urea a amonio (NH₄⁺) y amoníaco (NH₃) (Muck y Richlards, 1980; Varel *et al.*, 1999). A su vez, las excretas generadas en estos sistemas se concentran en áreas reducidas, al permanecer un gran número de animales en sectores reducidos durante períodos prolongados, aumentan el riesgo de contaminación puntual y de interferencia en el reciclaje natural de nutrientes (Atkinson y Watson 1996; Gil *et al.*, 2006). Además, la acumulación de excretas como su reutilización como fertilizantes traen consigo una preocupación que se manifiesta en el ámbito mundial, que es la presencia de residuos de drogas veterinarias, denominados “microcontaminantes emergentes” que son de alta persistencia (Teuber 2001; Boxal *et al.*, 2004). Los COV (compuestos orgánicos volátiles), agrupan a una gran cantidad de sustancias químicas que se convierten fácilmente en vapores o gases, siendo el principal inconveniente medioambiental la formación de ozono troposférico, que contribuye al problema del smog fotoquímico. Los AGV y COV presentan correlación con la producción de olor (Zahn *et al.*, 2001), por lo que limitando su producción se podría disminuir la emisión de olor de los sistemas ganaderos. Por otro lado, del análisis de los flujos de fósforo (P) y N₂ realizado en China por Ma y otros (2010), determinaron que sólo un 11% de N₂ es utilizado por animal, emitiendo a la atmósfera 47% y perdiéndose 41% en cuerpos de agua. Las pérdidas de NH₃ o N₂O de los residuos animales varían en función del manejo del mismo. Frecuentemente ocurre una interacción negativa entre NH₃ y N₂O, cuando el acumulado de los residuos sólidos es removido, genera la entrada de oxígeno (O₂) constituyendo un ambiente aeróbico, en esta situación se ve favorecida la formación de NH₃ por la que las pérdida de esta forma son mayores que las de N₂O

(Amon *et al.*, 2006). En el caso de los tratamiento líquidos, al generarse una costra en la superficie, o cuando se coloca alguna membrana se limita la entrada de O₂, generando un ambiente anaeróbico, cuyo efecto es la disminución de NH₃, pero aumenta N₂O (Sommer *et al.*, 2000; Vanderzaag *et al.*, 2011). Sin embargo, Sommer (2010) mostró que al cubrir con membrana sintética las piletas de los efluentes se produce una interferencia en el desarrollo de bacterias nitrificantes y desnitrificantes, por lo que ambos gases disminuyen, siendo una alternativa de mitigación de estos sistemas de intensivos, reconociendo el efecto negativo al medio ambiente que genera la producción ganadera. El dilema se presenta al considerar que la tendencia del consumo per cápita de carne se duplica de acuerdo a lo proyectado para 2030 (WHO, 2008), por lo cual, el riesgo de desastres naturales sería inminente sino producimos sustentablemente. La interacción alimento, animal y suelo en el ambiente de producción intensivo es compleja, clarificar los efectos es crítico para establecer prácticas de manejo que minimicen el impacto ambiental. Es urgente la necesidad desarrollar efectivas medidas de adaptación y mitigación, siendo ineludible para estos sistemas intensivos de producción, conocer el origen y efecto de los residuos generados. Se planteó como objetivo de este ensayo determinar las concentraciones *in vitro* (laboratorio) e *in situ* (a campo) de los gases: oxígeno (O₂), metano (CH₄), monóxido de carbono (CO) y dióxido de carbono (CO₂).

7.2 MATERIALES Y MÉTODOS

La experiencia se efectuó en un establecimiento de engorde intensivo de bovinos situado en Latitud 33.70° Sur, Longitud 65.50° Oeste, próximo a la ciudad de Villa Mercedes (provincia de San Luis), durante los meses de Octubre-Noviembre, previo época de lluvia. Se registraron los factores climáticos de temperatura media diaria del aire, velocidad media del viento y humedad relativa. La dieta de los novillos en terminación expresada en base a materia seca (MS), contenía grano de maíz (*Zea mays*) 56%, Gluten Feed de maíz húmedo (GFh) 36%, cáscara de maní (*Arachis hypogaea*) 4.5% y suplemento vitamínico mineral 3.5% del total. Al no existir un protocolo estándar, se decidió medir cada muestra de aire por triplicado considerando el valor promedio.

7.2.1 Equipos

Se empleó un equipo detector de gases portátil Reike Keiki RH -515 (Fig.38) para determinar las concentraciones de O₂, CO₂, CH₄ y CO. Este detector combina sensores infrarrojo (NDIR), galvánico y de células electroquímicas, con rangos de medición entre 0 y 100% LEL (límite inferior de explosividad), o de 0 a 100% volumen (vol.) para CH₄; de 0 a 25% vol. para O₂; de 0 a 1000 ppm para CO y de 0 a 20% vol. para CO₂. Para la determinación de otros compuestos precursores de sustancias odoríferas se recurrió a un equipo Eagle 2, que utiliza sensores fotoionizables (PID) para aplicaciones con alta sensibilidad e infrarrojos, identificando NH₃ con un rango de 0 a 75 ppm, H₂S hasta una concentración de 100 ppm, y COV con un rango de 0 a 2000 ppm. En el procedimiento de medición el volumen de aire ingresa a la sonda conectada a una bomba de aspiración y, transcurridos 15 segundos para su estabilización, se lee la concentración en la pantalla del equipo.

FIGURA 38: Equipo Reike Keiki RH -515 y accesorio de adaptación para medición en superficies líquidas



7.2.2 Metodología de medición

7.2.2.1 *in situ*

El protocolo de las determinaciones *in situ* consistió en la medición de la concentración de los gases CH₄, CO, CO₂ y O₂ en 5 áreas relevantes del establecimiento (Fig. 39): a- corrales con animales (20m²/animal),

- b- corrales sin animales,
- c- trampa de sólidos o pileta de sedimentación,
- d- laguna anaeróbica de sedimentación y evaporación,
- e- laguna aeróbica de almacenamiento o facultativa

Se utilizó en cada corral una cámara estanca de 2 litros de capacidad que se ubicó a nivel del piso para evitar la corriente de aire interna, posicionándose en 4 sitios

al azar tanto en corrales con animales como sin ellos. En las áreas de trampa de sólidos y lagunas se utilizó una cámara estanca de 1 litro de capacidad de material liviano que flota en la superficie y conectada al equipo medidor con una manguera de goma de 2 m. Las mediciones se repitieron al mismo horario (12 AM) por 3 días consecutivos.

FIGURA 39: Imagen satelital del establecimiento de engorde intensivo comercial, con identificación de las 5 áreas de medición de calidad del aire.



7.2.2.2- *in vitro*

El protocolo en el laboratorio para evaluar las condiciones del medio sobre el estiércol, consistió en la medición de la concentración de los gases CH₄, CO y CO₂ contrastando 2 niveles de concentración de O₂. De la superficie de los corrales fueron extraídas muestras (estiércol), constituidas por tierra, heces y orina de los animales. Se colocó 250 g de esta mezcla, en un Erlenmeyer de 250 ml (12 unidades), conformando 2 tratamientos: T0- Ambiente aeróbico= 6 Erlenmeyer cerrados con algodón que permitía el intercambio de aire

T1- Ambiente anaeróbico= 6 Erlenmeyer cerrados con tapones de goma de cierre hermético.

Se incubaron las muestras en estufa de cultivo (37°C) por un período de 9 días, midiendo cada 48 h la concentración de gases. Quitados los tapones, se introdujo una sonda conectada a una bomba de aspiración y ésta al equipo que determina la concentración del volumen de aire que ingresa. El procedimiento se realizó en habitación cerrada para no afectar las condiciones de cada unidad experimental.

7.2.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se analizaron con el paquete estadístico SPSS (Statistical Package for the Social Sciences). Para poder evaluar el efecto de los distintos lugares de muestreo *in situ* sobre la concentración de gases, se planteó un análisis de la varianza realizando la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. Se analiza individualmente cada área (corrales, trampas y laguna) a través de un Anova y posterior comparación de medias. A los datos obtenidos en laboratorio se les realizó el análisis de varianza de un factor, tomando como unidad experimental cada erlenmeyer. Los modelos incluyeron tipo de fermentación, tiempo transcurrido y la interacción entre ambos. Las diferencias entre las medias de los cuadrados *in vivo* e *in vitro*, se testearon con el test de Tukey, aceptando como diferencia significativa $p < 0.05$.

7.3 RESULTADOS

Durante el período de medición a campo, las condiciones de humedad relativa, temperatura del aire y velocidad media del viento, permanecieron estables, determinando valores medios de 45%, 20°C y 9.3 km/h, respectivamente. Los valores medios de las emisiones de gases, cuantificadas por 3 días consecutivos en las 5 diferentes áreas muestran evidencias estadísticas de no presentar distribución normal y homogeneidad de la varianza según la prueba de Shapiro-Wilk y de Levene, ambos $p < 0.05$. Se establece la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis (Kruskal-Wallis, 1952), encontrando diferencias significativas ($p < 0.0001$) en la concentración de CH₄ y CO₂ entre las 5 áreas de medición como se observa en la Tabla XXVIII. Con respecto al CH₄, en los corrales con y sin animales el nivel de % LEL fue de 0,000; mientras que el valor más alto se registró en la trampa de sólidos (0,468% LEL) al igual que la concentración de CO₂ (0,232%). No se generó CO en ninguna área y la concentración de O₂ fue constante en todas las áreas (20,95%).

Tabla XXVIII: Determinación *in situ* de la concentración media de CH₄, O₂, CO y CO₂ del suelo en sistema intensivo de engorde bovino.

Área	CH ₄ % LEL*	CO ₂ %	O ₂ %
Con animal	0.00	0.17 (0.06)	20.95
Sin animal	0.00	0.10 (0.07)	20.95
Trampa sólido	0.46 (0.22)	0.23 (0.09)	20.95
Lag. anaeróbica	0.14 (0.72)	0.08 (0.03)	20.95
Laguna aeróbica	0.00	0.03 (0.01)	20.95

CH₄ H 45.95 p<0.001 / CO₂ H 34.01 p<0.001 D.E Desviación Estándar.
1% LEL= 5 % vol. = 50.000 ppm

En las trampas de sólidos existe diferencia significativa de acuerdo a la prueba de Kruskal Wallis entre CH₄ (p<0.000) y CO₂ (p=0.002), no así en la laguna de sedimentación y evaporación p=0.850 para CH₄ y p=0.767 CO₂, detectando sólo CO₂ en laguna aeróbica.

Profundizando el análisis sobre los gases determinados en cada en cada zona, se observan diferencia significativas en los corrales (Tabla XXIX) y trampa de sólidos (Tabla XXX) y no en laguna anaeróbica (Tabla XXXI). En la laguna facultativa sólo se detectó CO₂ (Tabla XXXII).

Tabla XXIX: Media de CO₂% en corrales

CO ₂	Media	Sig.
Con animales	0,1688 (0,064)	A
Sin animales	0,0994 (0,071)	B

Letras distintas en columnas indican diferencias significativas (p<= 0,05)

Tabla XXX: Media de CH₄% y CO₂% en Trampa de Sólidos

Gases	Media	Sig.
CH ₄ %	2,343 (1,136)	A
CO ₂ %	0,234 (0,087)	B

Letras distintas en columnas indican diferencias significativas (p<= 0,05)

Tabla XXXI: Media de CH₄% y CO₂% en Lagunas anaeróbicas

Gases	Media	Sig.
CH ₄ %	0,722 (0,365)	A
CO ₂ %	0,077(0,031)	A

Letras distintas en columnas indican diferencias significativas (p<= 0,05)

Tabla XXXII: Descriptivos de Laguna facultativa

Gas	Media	Desv.	Mínimo	Máximo
CO ₂ %	0,027	0,013	0,01	0,04

Los valores medios obtenidos en laboratorio sobre las concentraciones de CH₄, CO y CO₂ en condiciones aeróbicas y anaeróbicas generadas a partir de las 96 h en el interior de los erlenmeyer se presentan en la Tabla XXXIII. Se observa diferencia significativa ($p < 0,05$) en la concentración media de cada gas producido con y sin O₂. En condiciones aeróbicas no se detectaron CH₄ y CO, a diferencia de lo que sucede en condiciones anaeróbicas (CH₄ 0,109% LEL y CO 224,78 ppm). A su vez, la concentración de CO₂ incrementó casi 15 veces en ausencia de O₂. Por último, se observó una correlación positiva ($r = 0,731$, $p = 0,00048$) entre la concentración de CH₄ y CO₂.

Tabla XXXIII: Determinación *in vitro* de la concentración media de metano (CH₄), monóxido de carbono (CO) y dióxido de carbono (CO₂) del suelo del corral de engorde.

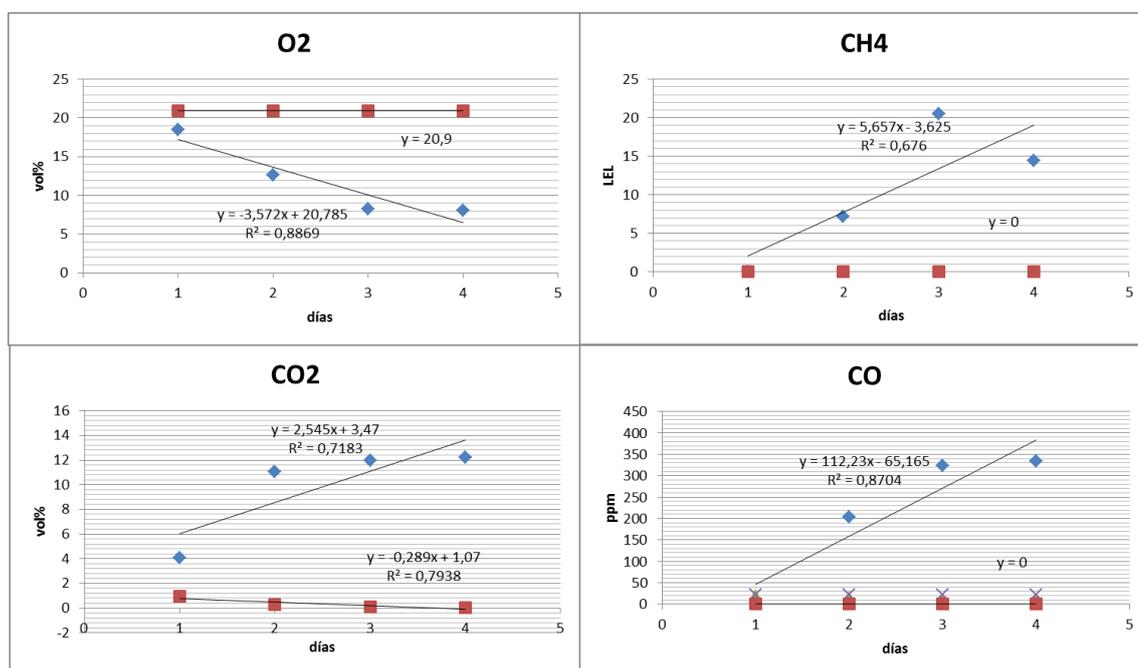
Tratamiento	CH ₄ %LEL*	CO ppm	CO ₂ %
Aeróbico	0.00 A	0.00 A	0.54 (1.47) A
Anaeróbico	0.10 (0.10) B	224.7 (293) B	8.22 (6.63) B

Letras distintas en columnas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$) (...)
Desviación Estándar. 1%LEL= 5 % vol. = 50.000ppm

En la Figura 40 se observa la tendencia en la producción de gases *in vitro* en función del tiempo para ambos tratamientos. Las curvas obtenidas en condiciones anaeróbicas presentaron diferencias significativas para CO ($p = 0,0189$), CH₄ ($p = 0,0004$), CO₂ ($p < 0,0001$) y O₂ ($p < 0,0001$), y describen una sigmoidea. Para el tratamiento aeróbico el comportamiento fue constante con una leve tendencia negativa para CO₂, no detectándose CO y CH₄ en el periodo de evaluación.

FIGURA 40: Dinámica de gases *in vitro* con distintas concentraciones de O₂

◆ ANAERÓBICO ■ AERÓBICO



7.4 DISCUSIÓN

La creciente importancia del efecto contaminante sobre el ambiente de los sistemas de engorde a corral, junto al progresivo aumento de estas instalaciones en la provincia de San Luis, han incentivado a la investigación en la búsqueda de una mejor gestión ambiental. El estiércol, si bien es un producto que inicialmente no contiene compuestos de alto riesgo ambiental, la acumulación de grandes volúmenes es un potencial foco de contaminación. Su impacto dependerá de las características intrínsecas y manejo del estiércol, debiendo ser las prácticas realizadas debidamente estudiadas y elaboradas para cada zona, de acuerdo con sus condiciones ambientales y de producción, y no de carácter general. Tanto los compuestos que generan olor como los GEI, son bioproductos de actividades microbianas que utilizan el sustrato que se encuentra en el estiércol, pudiéndose mitigar su efecto. En la explotación estudiada los olores de mayor potencial contaminante proceden tanto de las fuentes fijas (corrales, lagunas, trampas) como temporales (liberado desde el estiércol), teniendo las condiciones meteorológicas en gran medida incidencia en su formación como así también en su emisión. La metodología diseñada de la cámara de medición *in situ* genera una atmósfera constante que, sumado a la estabilidad climática en el periodo del

ensayo, contribuyó a minimizar el efecto de la dilución de los gases, y a alcanzar resultados repetitivos en la generalidad de los mismos. La carga bacteriana de las heces, y las condiciones del medio, impactan sobre la actividad microbiana asociándose con el metabolismo fermentativo, la emisión de olores, GEI y pérdida de N_2 . Una amplia superficie de los suelos del feedlot, se encuentra en contacto con el oxígeno, bajo contenido de humedad y estiércol fresco, en el cual predominan el metabolismo aeróbico, por ejemplo corrales, donde sólo se observó CO_2 , sin embargo, esta situación frágil se reinvierte por factores como agua, tiempo y cantidad de estiércol. En trampa de sólidos y lagunas, se verificó las condiciones anaeróbicas a través de la presencia de CH_4 y CO_2 . Este tipo de fermentación, sería la responsable de no sólo la generación de GEI, sino también olor. Por otro lado, la disminución del pH en estos suelos generada por la acumulación del ácido láctico y AGV, producto de la actividad microbiana afecta los organismos metanogénicos lo que explicaría su baja presencia en todo el sistema en relación con CO_2 .

Del resultado en laboratorio al iniciar con la concentración de los gases normales del ambiente (O_2 21%) en ambos tratamiento, se observó un similar comportamiento en las primeras 24 h, hasta saturar el medio y dar lugar a las fermentaciones anaeróbico. Esta concentración tendió a disminuir, diferenciándose del tratamiento aeróbico que se mantuvo constante (20,9%). Las poblaciones de organismos existentes en el material incubado en el sistema cerrado van agotando el O_2 disponible debido a su respiración, lo que conduce al cambio mayoritariamente de una respiración aeróbica a una fermentación anaeróbica, efecto que se observa en el patrón de los gases al transcurrir los días del estudio observando un comportamiento equivalente entre el CO y el CO_2 , y a su vez inversamente proporcionales al O_2 . Las concentraciones del CO y CO_2 aumentaron al final del periodo de incubación y la de O_2 disminuyó. La curva sigmoidea de producción de CO_2 del tratamiento cerrado se estabilizó a las 120 h, por lo que se infiere que se ha alcanzado el máximo potencial de masa microbiana activa (fase estacionaria), comportamiento inverso al del O_2 , que se encuentra en la menor concentración. En el tratamiento aeróbico el CO_2 mostró una tendencia lineal decreciente. En el caso del CH_4 en condiciones anaeróbicas, éste llegó a su máxima concentración a las 168 h disminuyendo al transcurrir los días, lo que indica la estabilización del medio a causa de la autolimitación de la fermentación. Al convertir el almidón en ácido láctico, se genera la disminución del pH afectando la población de bacterias metanogénicas, y por consiguiente la disminución de la concentración de CH_4 .

Un comportamiento semejante podría generarse en el ambiente superficial del corral donde las heces frescas y efluentes líquidos proporcionan un inoculo para bacterias metanogénicas, estimulan el consumo de O_2 y conducen mayoritariamente a una digestión aeróbica que con el tiempo se transforma en fermentación anaeróbica. En el tratamiento aeróbico del laboratorio no se produce CO y CH_4 , manteniéndose la concentración de O_2 del medio ambiente, situación que sucedería en la superficie de los corrales, pudiendo modificarse en función de la humedad del suelo, la actividad microbiana, la temperatura, tiempo de deposición y prácticas de manejo. Incorporando estos resultados a la bibliografía, se observa que la actividad aeróbica sería menos contaminante en lo que se refiere a emisión de gases, pero este menor impacto podría asociarse a una menor actividad microbiana, disminuyendo la materia orgánica y aumentando las partículas de tierra en suspensión, afectando las vías respiratorias de los animales. Los resultados de las condiciones de incubación del ensayo, modificando un solo parámetro (O_2), lograron simular las múltiples interacciones que se generan entre los microorganismos y el medio, y describir las múltiples emisiones.

7.5 CONCLUSIÓN

Basados en los datos obtenidos en el trabajo, se concluye que la emisión de gases bajo condiciones aerobias es menos perjudicial que cuando tiene lugar en ausencia de O_2 , sin embargo, la situación aeróbica puede transformarse a anaeróbica al transcurrir el tiempo, o por algún factor externo (precipitaciones), siendo inevitable que ambas condiciones se produzcan en simultáneo. Por este motivo, sería necesario disminuir las fuentes de producción de fermentación anaeróbica a través de las buenas prácticas de manejo, controlando los sustratos en el estiércol a través de una justa y balanceada ración, como así también favoreciendo la población de bacterias lácticas de manera controlada a través del monitoreo de pH para no aumentar la emisión de SH_2 principal causante de olor desagradable en estos sistemas.

El conocimiento de las relaciones suelo-alimento-planta y la vulnerabilidad entre estas interacciones, conllevaría a la elección de estrategias de menor impacto ambiental en búsqueda de la sustentabilidad de los agroecosistemas. No obstante, es necesario realizar más investigación, especialmente si se considera que los sistemas de engorde a corral son muy complejos y heterogéneos.

Capítulo 8:

OPCIONES DE MITIGACIÓN DE GEI ASOCIADA AL SECTOR

GANADERO

8.1 INTRODUCCIÓN

Para emprender medidas de mitigación hay que considerar que el cambio climático es un problema mundial a largo plazo y comprende complejas interacciones entre procesos climáticos, ambientales, económicos, políticos, institucionales, sociales y tecnológicos, para lo cual se debe alcanzar una conciencia colectiva. Adaptación y mitigación, son claves para reducir los riesgos del cambio climático, sin embargo, sus efectos varían dependiendo del tiempo y el lugar. Los beneficios de la adaptación tienen un alcance de local a regional, y pueden ser inmediatos, en cambio, los de mitigación tendría beneficios mundiales pero perceptibles con los años. Para enfrentar las vulnerabilidades al cambio climático es necesaria la combinación de estrategias en la que se incluyan la mitigación, adaptación, investigación y desarrollo tecnológico, como lo involucra Watson (1996), en su trabajo de sobre ganadería. Él estimó que solamente mejorando la dieta de los rumiantes en el mundo se podría reducir la emisión anual de metano en unos 27 millones de toneladas, logrando minimizar lo proyectado por la FAO (2003) sobre el incremento con cabezas de ganado del 60% de la emisión de CH₄. La cantidad de metano producida y excretada depende fundamentalmente de dos factores: el tipo de animal (animales de mayor tamaño y/o mayor edad tienden a producir mayores cantidades de metano), y dieta (cuanto menos digestible es el alimento más metano se produce). Si bien el sistema digestivo es determinante debido a la fermentación entérica, otra de las vía de emisión de CH₄ se asocia al manejo del estiércol. Cuando el medio se va convirtiendo en reductor los microorganismos metanogénicos descomponen materiales orgánicos y producen metano. Por otro lado, coincidiendo con la visión de la FAO, la producción moderna de carne está orientada a aumentar los índices de extracción, es decir mayor cantidad de carne por unidad de área y de tiempo. Para alcanzarlos es necesario que los animales puedan ganar suficiente peso en cortos períodos, por lo que una reducción de la edad promedio del ganado de carne, y aumento de la digestibilidad de la dieta, redundaría en una inmediata reducción de las emisiones de metano. El incremento en la proporción de concentrados en la dieta en remplazo de los forrajes se relaciona directamente con una menor unidad de metano

por unidad de producto (Lovett *et al.*, 2004) o peso ganado (Boland *et al.*, 2009; McGeough *et al.*, 2010), el desafío es lograrlos de manera sustentable. Las investigaciones recientes apuntan a insumos de segunda y tercera generación, es decir, estrategia aplicada a la dieta y al manejo productivo; como también alteraciones en la funcionalidad ruminal y la selección animal

8.1.2 MODIFICACIONES EN LA DIETA

La manipulación de la microbiota a través del uso de aditivos, como los ionóferos, mejora la eficiencia de conversión del alimento. La adición de estos compuestos multivariados a las raciones de rumiantes afectan la fermentación ruminal, existiendo un grupo de grasas, como los ácidos grasos conjugados con calcio, grasas hidrogenadas de origen mineral, extracto de plantas, de semillas y grasas de residuos de procesados de alimentos, que no afectaría la digestión de las fibras (Jenkins, 2008), lo que aportaría energía extra y en algunos casos la disminución de CH₄. Weiss y Pinos-Rodríguez (2009) reportaron incremento en la producción de leche cuando se suplementó con 22.5g de grasa saturada*kgMS⁻¹ consumida, pero en dietas de baja proporción de forrajes, y no voluminosas, lo que indicaría que el efecto se diluye por lo cual se debería aumentar las cantidades. Palmquist y Jenkins (1980), recomiendan entre 60 y 80 g*kgMS⁻¹ de grasas totales en la dieta, como rango máximo para no afectar el consumo, sin embargo, otro consideran que afectaría la composición de la leche dependiendo de la dieta y estado de lactación (Chilliard y Ferlay, A. 2004; Glasser *et al.*, 2008). En relación al metano, Grainger (2011) determinó una relación lineal (Ecuación 18) entre la emisión de CH₄ y adicción de grasas a la dieta. En su estudio evaluó semillas de oleaginosas, aceite y grasas libres, no observando efecto en la emisión de CH₄ con las grasas protegidas (semillas) y rápidamente disponible en rumen (aceites), pero si con las grasas libres, a una dosis menor a 80 g*kgMS⁻¹. Además, determinó que por cada 10 g de incremento de grasa a la dieta se disminuye 1g de CH₄*kgMS⁻¹ consumida. Los derivados de subproductos con alto contenido de aceite, como los granos de destilería, pueden ofrecer una alternativa económicamente viable de mitigación, encontrando también efectos con el tiempo de suplementación, como lo demuestra otros dos trabajos de Grainger y otros (2010), quienes encontraron disminución en la producción de CH₄ con el aumento del período del tratamiento. Otros

estudios no encontraron interacción significativa entre las grasas y emisión de metano (Jordan, 2006).

$$y = 24.55 \pm 1.029 - 0.102 \pm 0.0147 * X$$

Ecuación 18

y= Producción de CH₄ (g*kgMS⁻¹ consumido), x=grasa total de la dieta (g*kgMS⁻¹)

Considerando correcta la suplementación energética con alto contenido en lípidos es una alternativa eficiente para la reducción de GEI, en dietas a base de pasturas, características en la zona de cría de San Luis, se dificultaría, siendo una opción interesante el uso de pastizales transgénicos con incrementos en el nivel de grasa en las hojas. Winichayakul y otros (2008), trabajaron con *Lolium multiflorum* modificado genéticamente en una acumulación de más del 40% de grasa en su hoja, obteniendo resultados positivos en la respuesta animal. Otra alternativa sería la suplementación de lípidos vehicularizada con agua. Osborne y compañía (2008), adicionaron aceite de pescado a través del agua de bebida, no observando disminución de consumo de agua y alimentos. Sin embargo, a través de experiencias de la zona, no es recomendable la suplementación a través de agua de bebida debido a las interacciones entre componentes químicos específicos para cada tipo de agua (Sager, comunicación Personal). Los resultados de ensayos sobre suplementación mineral en la EEA San Luis, a través del agua de bebida, mostraron respuestas dispares por las numerosas interacciones dependiendo de factores químicos, físicos y ambientales.

Dentro de los aditivos de mayor uso comercial se encuentra la monensina. Este iónoforo se aplica a la dieta de invernada para mejorar la eficiencia de conversión, metabolismo del nitrógeno, prevenir acidosis, cetosis, y además ha evidenciado reducción de CH₄ entre el 3 y 8% con dosificaciones entre 24-35 mg*kgMS consumida (Beauchemien *et al.*, 2008). Coincide en la recomendación como estrategia de mitigación de GEI, el trabajo del grupo de Martin (2010); no así el de Grainger (2010b), quienes al aplicarlo en raciones de tambo no observaron diferencias en la emisión de metano. En la búsqueda bibliográfica no se encontraron trabajos de levaduras evaluando la emisión de metano, pero de manera indirecta se podría relacionar con el estudio sobre cambio de vías metabólicas de Newbold y Rode (2006). Ellos proponen la selección de cepas de hongos que producen cambios en la partición de hidrógenos, por ende, afectarían la producción de CH₄. El problema principal de estos estudios radica en la metodología, la cual se ve limitada por las evaluaciones *in vivo*.

Otra de las prácticas de manejo que podría modificar la emisión de CH₄, es el tamaño insuficiente de las partículas de forraje que puede disminuir el pH ruminal (Yang y Beauchemin, 2009), lo cual afectaría la supervivencia de protozoos y archeasmetanogénicas. La supresión de los protozoarios debería disminuir la metanogénesis debido a que ellos transfieren los hidrógenos y formato en rutas que incluyen enzimas con enlaces hidrogenosoma (Morgavi *et al.*, 2013; Ushida, 2010). Además del reciclaje de N₂ intraruminal de los protozoos, permite que esta estrategia posibilite reducir simultáneamente N₂ y CH₄. Los resultados del capítulo 5 se relacionarían con las estrategias de mitigación del CH₄ entérico por la eficiencia en la utilización de nutrientes de la dieta, que sumado al análisis integral, por ejemplo, realizando el ciclo de vida del sistema productivo, mayor sería la respuesta positiva por tratarse de recursos de segunda generación. Al ser gluten feed el alimento evaluado en el capítulo 5, el efecto se potenciaría con los granos de destilería, al tener una fibra de menor tamaño y el efecto de la grasa antes mencionado. Firkinsy otros (2001) direccionaron sus investigaciones hacia la disponibilidad de nutrientes al animal, y en base a un potente metanálisis concluyen que el procesamiento de los granos para mejorar la digestibilidad del almidón en el rumen, tendrá un efecto negativo en la digestibilidad de la FDN, que sumada a la alta tasa de pasaje, la metanogénesis sería muy baja. Cuando el grano de maíz esta entero, se produce la mayor utilización del almidón hacia tracto posterior, este cambio de sitio de fermentación, representa otro tipo de ventaja al aumentar la retención de N₂ tisular, lo cual debería disminuir el N₂ excretado por orina, y por ende, potencial emisión de N₂O por la aplicación de estiércol (Reynolds *et al.*, 2001). En síntesis y con un enfoque holístico, la variación del sitio de fermentación es una excelente estrategia de mitigación ya que disminuye la metanogénesis en el animal y excreción de nitrógeno al ambiente.

8.1.3 MODIFICACIONES EN EL BOVINO

Dentro de las prácticas mitigantes que no presentan discusión se encuentra el mejoramiento y salud animal. Como se aclara en el capítulo 6, las interacciones entre los distintos factores involucrados en la producción (nutrición y sanidad animal) y los GEI, son difíciles de predecir. Tanto el metabolismo como respuesta animal, dependerá del factor inductor, como de las características y estado del inducido. Los resultados obtenidos por Yan y otros (2006), muestran la reducción de un 67% de CH₄ por unidad de producto, al utilizar un animal mejorado genéticamente, grande (peso 700 kg) para

obtener 10.000 kg de leche, versus dos de menor tamaño (550 kg). Si bien, se ha expresado que animales de mayor tamaño emiten mayor cantidad de CH₄, la mejor eficiencia en la utilización de nutrientes determinarían dichos resultados. El índice de consumo de alimento residual (CAR), ha demostrado tener un efecto en la emisión de CH₄, produciendo hasta un 28% menos aquellos animales con bajo CAR (Hegarty *et al.*, 2007). Esta variación se atribuye principalmente a recambio de proteínas, metabolismo tisular y estrés (Herd y Arthur, 2009). Las revisiones de Waghorn y Hegarty (2011), coinciden con Yan, considerando la necesidad de seleccionar animales de alta producción, ya que ello reduce las emisiones por unidad de producto. Sin embargo, no avalan lo referido al índice CAR, acotando que existe poca evidencia de que animales eficientes tengan una diferente producción de CH₄ por unidad del consumo de MS, concluyendo que dependería más de su carácter hereditario. De Haas y otros (2011), indican que la producción endógena de metano tiene una base genética, con índices de heredabilidad de 0.35, jugando los efectos ambientales un papel preponderante. De Haas, afirma que el CH₄ aumenta a medida que aumenta el gasto de energía en el mantenimiento, por ende, la ineficiencia de uso para la producción, y se reduce con el aumento de la proporción de consumo de energía metabólica dirigido a la producción y tejidos del cuerpo. Los avances en el conocimiento de las comunidades microbianas ruminales a través de la genómica (Leahy *et al.*, 2010; Attwood *et al.*, 2008) y metagenómica (Hess *et al.*, 2011; Morgavi *et al.*, 2010, 2013), han logrado alcanzar una nueva visión para el desarrollo de estrategias de mitigación. Se ha revelado, a través de las técnicas moleculares, que el sistema microbiano ruminal tiene mayor diversidad, influenciado por la especie animal, la raza y las condiciones ambientales. El uso de estas nuevas herramientas permite seleccionar animales de mayor productividad, siendo esta la estrategia individual más efectiva para la mitigación de los GEI, ya que permitiría una reducción del número de animales, manteniendo el mismo nivel de producción. Flachowsky (2011), estimó que las emisiones serían un 70 por ciento más bajas en los bovinos de carne con ganancias de 1.5 kg*día⁻¹, que en aquellos con ganancias de 1.0 kg*día⁻¹. El potencial genético de los animales y la disponibilidad de alimentos de buena calidad, son los principales factores a considerar para aumentar la producción, por lo que este potencial para optimizar el rendimiento animal, puede ser más pequeño en los países desarrollados donde los animales ya tienen una producción y eficacia relativamente alta (Tarawali *et al.*, 2011). Por otro lado, se debe evitar la importación de material genético sin su estudio previo, donde los animales no se encuentran en

condiciones adecuadas para alcanzar su óptimo confort, por causa que la respuesta sería contraria al no poder expresar su potencialidad de producción (Harris y Kolver, 2001). Otra técnica aplicada al animal es la defaunación ruminal, explicitado en la sección anterior. La eliminación de los protozoos ciliados del rumen reduce la emisión de metano entre 50 y 60% (Kawashima, 2006; Ushida, 2010). Indirectamente el uso de fotoquímicos inhibidores de protozoarios como por ejemplo las saponinas, podrían ser una elección para reducir las emisiones de metano ruminal (Cheeke, 2000). Por último, existen trabajos sobre el uso de somatotropina recombinante bovina (rbST) como táctica de mitigación de CH₄ reduciendo un 7.3% su emisión con aumento de la productividad en el ganado de leche (Capper *et al.*, 2008, 2012), sin embargo, su uso es cuestionado estando prohibido en algunos países (Canadá, Japón, la Unión Europea, Australia y Nueva Zelanda) que consideran una influencia negativa en la fertilidad y en la sanidad animal.

8.1.4 ANALISIS DEL SISTEMA PRODUCTIVO

Las interacciones entre el animal, el entorno y las prácticas de manejo interfieren en la mitigación de los GEI y de la productividad animal. Los efectos de estas prácticas pueden ser claros en ciertas etapas de producción, pero en todo el sistema son difíciles de medir, además suelen ser mutuamente excluyentes. Cuando se adoptan medidas de mitigación relacionadas con la nutrición animal debemos realizarlas de la manera sustentable, no solo tratando de generar la menor contaminación sino también producir mayor cantidad de alimento. Para asegurar acciones de mitigación de CH₄ entérico eficientes, esta no debe incrementar otros GEI del sistema; para lo cual el Análisis del Ciclo de Vida (ACV), presenta la capacidad de predecir dichos impactos (Williams *et al.*, 2014; Zehetmeier *et al.*, 2014). La disminución de un nutriente dará lugar al aumento de otro, tal es el caso de la relación de N₂ y CH₄, que se corrobora con el modelo ruminal de Dijkstra y otros (2011). La nutrición mejorada, por ejemplo, a través de la digestibilidad con la inclusión de granos en las dietas, genera controversias. Beauchemin y compañía (2011), afirman que los sistemas de producción de rumiantes basados en alimentos concentrados pueden ser más eficientes desde la perspectiva del animal y de las emisiones de los GEI por unidad de producto, pero es necesario recurrir a los ACV para determinar que sucede cuando se consideran las emisiones asociadas a la producción, el transporte y al procesamiento de los granos y forrajes. Los resultados del capítulo 5 en dietas a base a gluten feed, muestran cómo el aumento de la

digestibilidad de la dieta se correlaciona con un aumento en la emisión de gases totales, pero cuando se expresa por unidad de producto, los resultados se invierten. La concentración de metano en rumen fue mayor (18,54 % CH₄) en la ración a base de gluten feed, y de 13,49 en la mezcla de GF+SS (gluten feed y silaje de sorgo), que al expresarlo en función a los kilos de carne producida, el ranking de puestos cambio, pasando a generar menor cantidad de CH₄ la dieta 100% GF (29.42 y 32.11 kgCH₄/kg de carne, para GF y GF+SS, respectivamente). En nuestro análisis no se consideran gastos extras del transporte, los cuales serían elevados debido al alto contenido de humedad del subproducto. Además si se contabiliza el elevado contenido proteico del GF (25% PB), conociendo que el exceso lo debe eliminar, las cantidades de N₂ en heces que se deposita en los suelo, podría aumentar la volatilización, especialmente en sistemas intensivos. Sin embargo, esto efectos negativos pueden ser compensados en el balance energético, al utilizar un subproducto como alimento. La transformación de esteresiduo, de bajo costo, en un recurso alimenticio de alto valor biológico (carne o leche), permite aumentar la producción, como también, disminuye la demanda de grano, para ser utilizado en la alimentación humana. Franks y Hadinghan (2012), concluyen que para una eficiente reducción de los GEI, la evaluación del impacto de las prácticas de manejo, correspondiente a la agricultura, debe realizarse en función al total neto del sistema productivo. En los protocolos del IPCC, el exceso de N₂ excretado por orina impacta en la cuantificación de GEI, presentando un potencial de calentamiento 298 veces más potente que el CO₂. Cuando se analiza la huella de carbono, al contabilizar las emisiones de CO₂eq., el 2% del N₂ excretado como urea en la orina proviene del exceso de amoníaco ruminal, debiendo sumar la emisión de NH₃ del estiércol y N₂O del suelo (Sommer, 2001).

Una alternativa de mitigación sería el agregado de glucosa a nivel ruminal, disminuyendo la pérdida de NH₃ por aumento de la actividad bacteriana y competencia por los aa de las bacterias amilolíticas y proteolíticas (Hristov *et al.*, 2013). Otra opción es la inclusión de taninos bajo las condiciones reductoras del rumen, generan un complejo que enlaza al N₂. La principal emisión de los compuestos nitrogenados se relaciona con el manejo de estiércol en los sistemas intensivos de producción animal. Cuando las excretas están sobre superficie se espera menor emisión de N₂O que cuando se incorpora al suelo, pero se produce mayor pérdida como NH₃. La acidificación del estiércol o su almacenamiento en ambientes frescos pueden incrementar potencialmente las emisiones N₂O. Dentro de las opciones de mitigación, la disminución del tiempo de

almacenamiento y aireación buscan disminuir los procesos de fermentación de los MO. Efecto contrario se da al cubrir el estiércol, en el caso de las cubiertas semipermeables disminuyen la emisión de metano y olor, pero aumentarían las de N_2O que se concentra en los efluentes. En el caso de tratarse de membranas impermeables puede acumularse CH_4 cuya combustión generaría calor o electricidad. Los digestores anaeróbicos son una recomendable estrategia por tratarse de generación de energía renovables. Las desventajas de este sistema es que requiere una alta inversión de capital, por lo que su aplicación se ve favorecida cuando existen incentivos económicos. Cuando se analiza la huella de carbono de los sistemas de carne, la producción de alimento (confección de silajes), es la actividad que mayor contribuye, en lo que se refiere al uso de energía (combustible), pero desde el punto de vista de la huella ecológica, este aporte puede variar, debido que se considera el uso de la tierra e interacción de los distintos factores del sistema (ocupación de la tierra para producción de granos o pastura, sistema extensivo o intensivo, fase de cría, recria o finalización, etc.). Si bien, la emisión de metano entérico es el principal contribuyente de los GEI en la ganadería, el manejo del estiércol (emisión de compuestos nitrogenados) contribuye sustancialmente, se podría decir que en dietas altamente concentradas para animales en la fase de terminación, emiten menos metano por unidad de producto ($CH_4 \cdot kg \text{ ganado}^{-1}$), o por consumo ($kg \text{ consumido} \cdot CH_4^{-1}$), sin embargo estas diferencias son compensadas con la mayor emisión de NO_2 y CO_2 , cuando se tiene en cuenta para determinar la huella de carbono, y en especial cuando se tiene en cuenta el secuestro de C del suelo en los sistemas extensivos.

8.1.5 CONTAMINACIÓN EN SISTEMAS INTENSIVOS. OLOR

Otros impactos al medio ambiente relacionado con los efluentes de los sistemas pecuarios intensivos, son los elevados volúmenes de desechos de nitrógeno y fósforo, así como descargas concentradas de materiales tóxicos. La emisión de NH_3 a partir del nitrógeno de las excretas, se disipa en la atmósfera, y además es de desagradable olor (Shultz, 1993). Por otro lado, los resultados del informe de la FAO donde examina las repercusiones directas del sector pecuario y los efectos ambientales de los cambios asociados al ganado en la gran sombra del ganado (FAO, 2006), señala que la distribución regional de los sistemas intensivos no suele estar determinada por prioridades ambientales, sino por la facilidad de acceso a los mercados de insumos y

productos, y por el costo relativo de la tierra y la mano de obra. En los países en desarrollo, las unidades industriales a menudo se concentran en zonas periurbanas debido a las limitaciones de infraestructura, por lo que los problemas ambientales creados por los sistemas de producción industrial no derivan de su gran dimensión, ni de la intensidad de la producción, sino de su ubicación geográfica, afectando la calidad de vida de los ciudadanos. El riesgo a la población cercana consiste en la proliferación de vectores de enfermedades; y en el caso de los olores que desprenden estos sistemas animales intensivos, producen severos trastornos en el sentido del olfato y del gusto, con sus secuelas negativas sobre el apetito, las vías respiratorias y sistema digestivo. La contaminación odorífica es un problema de difícil manejo, debido a la complejidad para cuantificar, variando en función de la persona que la considera (Bottcher, 2001). Aunque, no se ha podido establecer una relación directa entre el olor de las sustancias y su toxicidad, expresada como efectos patógenos, se han observado reacciones fisiológicas no toxicológicas causadas por olores actuando sobre el sistema nervioso central o periférico (Yocom y McCarthy, 1991). La mayoría de las muestras del aire oloroso contienen una mezcla de sustancias olorosas, con umbrales de cada olor diverso, lo que hace casi imposible tener un analizador, que permita cuantificar y distinguir entre estos componentes. Existen cuatro atributos del sentido del olfato importantes en las mediciones de olores; éstos son intensidad, capacidad, calidad y aceptabilidad (Wark, 1992). La intensidad se define como la magnitud de la sensación percibida y representa alguna indicación, numérica o verbal, de la fuerza del olor. Por su parte, la capacidad de detección se refiere al cambio de la magnitud, la calidad describe las características de los olores en términos de la asociación con un odorante conocido, y por último, la aceptabilidad indica el grado de agrado o desagradado de la sensación olor. El método olfativo consiste en la toma de muestras del aire de la fuente olorosa en una cáscara de nuez, para ser medidas por un panel de gente adiestradas, sometidas a determinadas concentraciones de sustancias olorosas. A pesar de existir parámetros que definen el olor, como el umbral, siguen siendo subjetivos.

La defensa del medioambiente ha ido adquiriendo una importancia creciente, el problema de la contaminación por malos olores es un problema que empieza a ser tratado recién en los últimos 20 años. El derecho a vivir en un medioambiente libre de contaminación hace referencia a factores que su presencia pueda afectar el bienestar de vida de la población. El resguardo del medioambiente es clave para el crecimiento del sector agropecuario, esto implica el análisis de las relaciones causa-efecto no sólo sobre

los recursos naturales, sino también sobre la calidad de vida de los ciudadanos, por ello se plantea como objetivo de este capítulo evaluar la eficacia de un producto enzimático viable para disminuir la producción y acumulación de compuestos odoríferos, en busca de minimizar o contrarrestar sus efectos a la población circundante.

8.2. MATERIALES Y MÉTODOS

La ubicación y características del establecimiento de engorde intensivo se especifican en capítulo 7. Las mediciones de los gases se realizaron, previo época de lluvia (octubre). Se registraron los factores climáticos de temperatura media diurna del aire, velocidad media del viento y humedad relativa. Al no existir un protocolo estándar, se decidió medir cada muestra de aire por triplicado, considerando el valor promedio, siguiendo metodología desarrollada en capítulos 3 y 7. En la etapa inicial del tratamiento bacteriano, se aplica en la trampa de sólidos, un complejo enzimático comercial siguiendo las instrucciones del fabricante. Previo del agregado del producto comercial, se realizó un monitoreo por 3 días consecutivos de los gases metano (CH_4), amoníaco (NH_3), sulfuro de hidrógeno (SH_2), dióxido de carbono (CO_2) y compuestos orgánicos volátiles (COV). Se utilizó una cámara estanca de 1 litro de capacidad de material liviano conectado al equipo medidor portátil EAGLE 2, RKI por intermedio de una manguera de goma de 2 m que se deja flotando en la superficie entre 10 y 15 minutos previamente para permitir su estabilización. Transcurridos 7 días, se repiten las mediciones. Se empleó un equipo detector de gases portátil Reike Keiki RH -515, para determinar las concentraciones de CO_2 y CH_4 . Este detector combina sensores infrarrojo (NDIR), galvánico y de células electroquímicas, con rangos de medición entre 0 y 100% LEL (límite inferior de explosividad), o de 0 a 100% volumen (vol.) para CH_4 y de 0 a 20% vol. para CO_2 . Para la determinación de otros compuestos precursores de sustancias odoríferas se recurrió a un equipo Eagle 2, a través de sensores fotoionizables (PID) e infrarrojos, se identifica NH_3 con un rango de 0 a 75 ppm, H_2S hasta una concentración de 100 ppm, y COV con un rango de 0 a 2000 ppm. En el procedimiento de medición el volumen de aire ingresa a la sonda conectada a una bomba de aspiración y, transcurridos 15 segundos para su estabilización, se lee la concentración en la pantalla del equipo. El protocolo de las determinaciones in situ consistió en la medición de la concentración de los gases utilizando una cámara estanca de 1 litro de capacidad de material liviano que flota en la superficie y conectada al equipo medidor con una manguera de goma.

8.2.1 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se analizaron con el paquete estadístico SPSS (Statistical Package for the Social Sciences). Por tratarse de la misma unidad experimental observada en distintos momentos, se realiza la Prueba “T” para observaciones apareadas, midiendo los gases antes y después de aplicar el tratamiento.

8.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados (Tabla XXXIV) indican que hay diferencias altamente significativas para amoníaco, sulfuro de hidrógeno y compuestos orgánicos volátiles, cuando se comparan pre y post tratamiento, indicando que el procedimiento de análisis es lo suficientemente sensible. Se observa una disminución en los gases NH₃ y COV, sin embargo, el SH₂ pos tratamiento aumenta, indicado como el principal causante de olor, lo que sugeriría la baja efectividad en lo referido a el olor.

Tabla XXXIV: Resumen Descriptivos y T – Ensayo enzimático

	CH₄ %	NH₃ ppm	H₂S ppm	COV ppm	CO₂ %
Media	875,42	7,21	2,15	14,54	0,40
Pretratamiento	(111,59)	(3,74)	(4,80)	(6,65)	(1,00)
Media	823,33	3,58	4,67	6,50	0,43
Postratamiento	(271,22)	(2,97)	(9,14)	(5,54)	(0,23)
Diferencia entre	52.08	3.63	2.52	8.04	0.03
Pre y Postrat.	(210.36)	(4.03)	(2.16)	(8.78)	(0.17)
Valor de T	1.21	4.41	5.71	4.49	0.97
Valor de P	0.2375	0.0002 *	0.0412 *	0.0002*	0.8675

Indica diferencias significativas antes y después del tratamiento.(..) Desviación Típica

El producto aplicado actúa como catalizador de las reacciones bioquímicas especiales que descomponen los carbohidratos, grasas, y proteínas en los productos necesarios para el metabolismo celular, evidenciado en el aumento de los gases totales. Una vez que los metabolitos celulares han sido reducidos, las bacterias en los sitios donde se agregó el producto, se multiplican y pueden segregar más enzimas propias e ingerir más productos residuales. Fundamentalmente, esto da lugar a una reacción en cadena que puede continuar, buscando que la mayor parte de los productos orgánicos haya desaparecido a través de reacciones que no generen olor. Nuestro resultado indica

que el producto aplicado modifica las reacciones biológicas de los desechos del sistema, acelera la degradación disminuyendo las exhalaciones de algunos gases contaminantes, pero no el responsable principal de olores desagradables, debido que el olor es causado por la proporción de sulfuros libres y no con cambios de otros metabolitos producidos por las bacterias. Para poder evaluar la eficacia del producto, se eligió como indicador de la respuesta al producto enzimático, el H_2S al ser un compuesto característico de la fermentación de estos sistemas, y de fuerte poder odorífero (Bradley, *et al.* 2011). Compuestos como H_2S libera su olor a concentraciones 0.000047 ppm y 0.037 ppm NH_3 con olor característico afinado y penetrante en este último, y a huevo podrido H_2S . Estos gases representan riesgos directos a la salud debido a que el amoníaco es irritante por lo que tiende a producir malestar en los animales. El amoníaco proviene del nitrógeno excretado principalmente en la orina (85%) y en las heces (15%) y su tasa de volatilización depende de la relación existente entre los iones amonio y amoníaco la cual depende del pH de la excreta (Hoeksma *et al.*, 1992). Así mismo, la producción de bióxido de carbono (CO_2) y metano (CH_4) contribuye al efecto invernadero mundial (Kirchgessner *et al.*, 1990). Las muestras del aire obtenidas contienen un cóctel de sustancias olorosas, pero nos basamos en el umbral de H_2S por ser el mayor que otros compuestos. Debido a que los malos olores se enmascaran, o se potencian, dependiendo de las mezclas (y de las proporciones en estas mezclas), también se midieron otros compuestos como NH_3 y COV. Los resultados muestran disminución significativa en la concentración de NH_3 y COV, y un aumento en H_2S , antes y después de la aplicación del tratamiento. Un mejor entendimiento de las relaciones entre la dieta del ganado, tipo de fermentación de los microorganismos de heces y suelo, permitirá adoptar nuevos métodos y herramientas que sean adecuadas a cada situación, considerando como la medida más acertada el mejorar la eficiencia alimenticia y por ende la retención de nutrimentos en el animal, hechos que se traducen en una menor contaminación ambiente. El éxito de las estrategias de mitigación se basan en el entendimiento de las interacciones complejas entre las comunidades microbianas del rumen y la alimentación cruzada entre las especies.

8.4 CONCLUSIÓN

Existen muchas medidas para mitigar, remediar o compensar los efectos al medio ambiente que genera la producción animal, se proponen cambios tecnológicos y

de gestión aplicados a la dieta, el animal y la interacción entre ellos. El desafío de nuestra sociedad en este aspecto radica en gestionar los recursos naturales que están a disposición de forma adecuada en pos de preservar el equilibrio ecológico y, de esta manera, apostar por el desarrollo sustentable como forma de producción y conseguir así una optimización de los beneficios. Lograr un equilibrio entre la producción intensiva y las poblaciones vecinas es necesario desarrollar un programa de acciones preventivas y correctivas para la disminución de los eventuales impactos ambientales.

Capítulo 9:

INTEGRACIÓN

La emisión de gases de los sistemas productivos ganaderos es de particular interés por sus consecuencias sobre el cambio climático. Como se ha estado mencionando en el desarrollo del escrito, la generación de CH₄ del sector agrícola genera un importante impacto en los GEI a nivel mundial, y actualmente, representa el 40% de la producción antropogénica (Key y Tallard, 2008), y de ellos el 25% corresponde a fermentación entérica. Por otro lado, el uso de la tierra para la ganadería disminuye la disponibilidad para otros alimentos, responsabilizándola de gran parte de la degradación de recursos hídricos y suelos. El problema se acrecienta si se considera que la mayoría de los modelos de desarrollo (FAO, 2004, 2011) indican en el 2050 la duplicación de habitantes en el mundo, que a su vez, aumentarían el consumo de proteína de origen animal per cápita, alcanzando 52 kg de carne y 115 kg de leche por año, lo que representa una suba del 70% y 45% al comparar con actuales valores. Los países de alto poder adquisitivo al tener mayor acceso a bienes y servicios, podrán intensificar su producción y cubrir la demanda, lo que conllevaría a problemas ambientales de contaminación de agua y suelo (IAASTD, 2008). En cambio, en los países subdesarrollados donde los recursos son escasos, la aplicación de tecnología es baja, las consecuencias serían degradación de suelos y desertificación (FAO, 2006). Ante este escenario, Pretty (2008) sugirió, como alternativa de desarrollo, la intensificación sustentable, es decir, el uso de conocimiento y tecnologías para producir más alimento, en una misma área y con menores recursos. Para alcanzar este propósito, será necesario el compromiso de áreas gubernamentales y científicas trabajando en el desarrollo de herramientas fiscales y regulatorias, orientadas hacia una misma dirección de políticas limpias y sostenibles en el tiempo. Conscientes que para ello es imprescindible el conocimiento, esta tesis intenta aportar a través de información en la temática. En los diferentes capítulos, se han ido desarrollando ensayos adaptados a las características geográficas, ambientales y socioeconómicas de la provincia de San Luis, en un contexto científico, lo que permite extrapolar resultados a diferentes sistemas productivos. Por tratarse de temas emergentes, en el capítulo 1 se realiza la introducción a la materia, se muestra los mecanismos y factores que intervienen en la producción de gases de

fermentación entérica, y su impacto al medio ambiente. La gran cantidad bibliográfica con resultados contradictorios, la falta de estandarización de metodologías y el uso de diferentes unidades de expresión, fueron obstáculos para el avance de la investigación. La elección de las unidades tiene importante implicancias para la interpretación de los resultados, algunos estudios expresan sus resultados en cantidad de gas por día, por año (Fundación Bariloche, 2005; SAyDS, 2007); en base al producto, por ejemplo, en kg carne (Elizalde *et al.*, 2015), kg de leche (FAO, 2010); otros trabajos en base a porcentaje de proteína (Stewart *et al.*, 2009), carne sin hueso (Cederberg y Stadig, 2003), en función del área por hectárea (Beukes *et al.*, 2010; White *et al.*, 2010) o por explotación (Pelletier *et al.*, 2010). White y compañía (2010), mostraron que aunque las emisiones por ha aumentaran con la intensificación, cuando se considera la productividad (emisión*kg⁻¹ carne) disminuye. Esto es consistente con las conclusiones obtenidas por Crosson y otros (2011), quienes afirman que la intensificación aumenta la emisión*ha⁻¹*establecimiento⁻¹, pero disminuye la emisión*kg carne⁻¹, con la premisa del control en la fertilización de compuestos nitrogenados sobre las pasturas y cultivos. Varios autores coinciden en ello; sin embargo, Casey y Holden (2006), encontraron un aumento en la emisión*ha⁻¹ y emisión*kg carne⁻¹, cuando se intensificaba la producción a causa del incremento de N₂ en la aplicación de fertilizante, y el aumento de concentrados en la dieta. Si bien estos autores determinaron una superioridad productiva del 15%, no se correlacionó con la eficiencia del sistema, de acuerdo a los resultados de huella de carbono (HC). Actualmente lo que se busca en las evaluaciones de los sistemas es ampliar la visión, surgiendo como herramienta de análisis el ciclo de vida (ACV). Este parámetro investiga y evalúa los impactos ambientales de un producto o servicio durante todas las etapas de su existencia (extracción, producción, distribución, uso y desecho), siendo HC el componente del ACV que contempla el impacto por calentamiento global de la atmósfera. En el caso de la HC de productos derivados de la agricultura, difieren de otros sectores como energía y transporte, ya que los GEI que principalmente se emiten no son CO₂, sino CH₄ y N₂O. Para evaluar la situación de la provincia de San Luis, en el capítulo 2 se aplican las metodologías de estimación para la HC de la agricultura, empleando las recomendaciones del IPCC, por ser las reconocidas mundialmente y aceptadas en la realización de los Inventarios de Gases Invernaderos. La emisión de CH₄ en rumiantes varía en base a la localización geográfica, la composición y la calidad de los alimentos, el consumo, su procesamiento y la raza animal (Capítulo 2). Esa fue la principal causa que induce a la realización del primer

inventario de fermentación entérica en bovinos de carne de la provincia de San Luis (Guzmán y Sager, 2010). Se destaca como debilidad de las metodologías del IPCC, la falta de consideración en diferentes sistemas de producción y características de las áreas. Los niveles de complejidad en la determinaciones de los GEI propuestas por el IPCC, adaptan los factores de emisión a macro escalas y en menor medida a micro escalas en base a diferentes características y factores del sistema, sin embargo, el análisis comparativo realizado en el capítulo 2 entre los niveles N1, N2 y N3, no mostró diferencias significativas. Se considera que los valores por defecto utilizados en los niveles 1 y 2, se determinaron en base a sistemas representativos del área, coincidente con las características en la producción de carne del sistema analizado. Además el factor Y_m , que responde a la proporción de energía del alimento que se pierde en forma de CH_4 , fue calculado, utilizando la información real del alimento analizado analíticamente en el laboratorio. Coincidiendo con la bibliografía, se observó un incremento de la sensibilidad para capturar los efectos de las actividades a nivel predio en N3, siendo un parámetro a considerar en la elección del nivel de estimación a realizar. Los modelos empíricos aplicados en N1 y N2 no ofrecen suficiente alcance para evaluar opciones de mitigación, pero si son adecuados para proponer políticas ambientales. A diferencia, el N3 basa sus cálculos en modelos mecanísticos y dinámicos, siendo crítico en implantación de efectivas estrategias a nivel predial.

En los capítulos 3 y 4 se desarrollan nuevas metodologías de medición de gases de fermentación ruminal. Debido a lo costoso, dificultoso y prolongados en el tiempo de las prácticas de estudios *in vivo*, se considera la necesidad de herramientas de selección (screening) para evaluar materiales de una manera rápida y sencilla. Surgen así los objetivos del capítulo 4. A partir de técnicas *in vitro* usando micro fermentadores (Equipo Ankom RF), se determina la cinética instantáneamente de la degradación de alimentos en rumen, a través de señales automáticas enviadas a un servidor, determinado el volumen total de los gases hasta 48 h. La principal ventaja del sistema es la capacidad de obtener alto volumen de datos, permitiendo una mayor precisión de los resultados. En contrapartida, es un sistema estático, no considera consumo, tasa de pasaje y la absorción de AGV. En base a los resultados obtenidos, se determina que el modelo monomolecular explica mejor la cinética en base al mejor balance entre capacidad de ajuste de los datos y coherencia biológica. Se realizaron corridas con alimentos voluminosos y concentrados, aplicando los modelos monomolecular,

polinomial cúbica, logístico y Gompertz, presentando el menor CME y BIC el primero (Guzmán *et al*, 2014). A pesar de no lograr determinar la concentración e identificación de los gases fermentados, se sugiere al equipo como eficaz herramienta en la evaluación de alimentos para rumiantes. En el capítulo 3, se explicita una innovadora y sencilla técnica desarrollada en la estación experimental de INTA San Luis, para determinar la concentración ruminal de gases, CH₄, CO₂, SH₂, CO, O₂ y pH, a campo en animales vivos. Lo interesante radica en conocer que está sucediendo al instante en el rumen del animal, además del recupero de los mismos. Cabe aclarar que todos los procedimientos involucrados con el manejo de los animales, fueron conducidas bajo protocolos del Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL, 2014). Se trabaja paralelamente en busca de alternativas de bienestar animal. En el capítulo 6, se cita el trabajo final de la especialización de Alimentación Bovina (Guzmán, 2011), titulado: Comparación de inóculos microbianos en la determinación de digestibilidad *in vitro*, cuyo objeto fue eliminar cirugías mayores para la colocación de fistulas ruminales de 10 cm que actualmente se usan para las técnicas de digestibilidad *in situ* e *in vitro*. Si bien, el nuevo método propuesto en el capítulo 3 utiliza una cánula ruminal, el diámetro de pequeño calibre (0.5 cm) se puede realizar de forma rápida con un mínimo instrumental quirúrgico, baja posibilidad de infección y mínima inflamación.

En la tesis se enfatizó el análisis de alimentos, tipo de animales y características de los sistemas de producción bovina de la provincia de San Luis. La composición química de los alimentos puede influenciar en los patrones de fermentación y subsecuentemente emisión de metano. Como vimos en el capítulo 1, el metano se genera como subproducto de la fermentación anaeróbica que la realizan principalmente en el rumen las *arqueas metanogenas*, sin embargo, en el capítulo 8 se citan recientes trabajos de metagenómica, no se encontró relación directa entre cantidad de metanógenos y emisión de metano, considerando varias alternativas generar CH₄. La imposibilidad de los animales de utilizar el CH₄ representa una pérdida energética del alimento consumido, que debe ser eliminado hacia el exterior, aumentando los niveles de metano en la atmósfera con efecto contaminante (cap.1, 5 y 8). Una manera de reducir las emisiones de CH₄ entérico, de acuerdo evidenciado en capítulo 5, es a través de la manipulación de la dieta. Se ha estimado que la ganadería del mundo consume más del 37% de los granos producidos (ACFA, 2002), lo que sumado a la baja eficiencia de conversión de los rumiantes, la inclusión de subproductos en la dieta sería una

alternativa viable de desarrollo sustentable. Edwards-Jone (2008) junto a su grupo de investigación determinó que se emite 16 kgCO₂eq. por kg de carne y 0.8 kgCO₂eq. por kg de semilla de trigo, y menos aún, 0.4 kgCO₂eq para producir un kilo de lechuga; sin embargo estos alimentos presentan distintos roles nutricionales y al comparar en función a las calorías consumidas, estos valores difieren, para lo cual no existe actualmente tierras disponibles para alcanzar a producir las calorías necesarias que cubran nutricionalmente los requerimientos de la población humana. Srinivasan y compañía (2006), examina en su trabajo lo que sucedería al reemplazar el consumo de proteínas animal por vegetal, concluyendo la necesidad de un incremento de tierras aptas para la producción de cultivos, limitantes actualmente, lo que quizás conllevaría al uso de áreas frágiles consumiendo mayor cantidad de productos que derivarían en mayor emisión de CO₂eq. Williams y otros (2006), basan su análisis en soja (*Glycine max*), por presentar un alto aporte proteico, sin embargo, coinciden con las conclusiones de Srinivasan. Actualmente, la sustitución de las carnes rojas es un tema cuestionable, la necesidad de productos animal dependerá de las existencias de políticas de seguridad alimentaria y disponibilidad de sustitutos de alimentos, ambos críticos al considerar el peligro nutricional del cambio. La oferta de co y subproductos derivados de distintas industrias, resulta una potencial ventaja en las estrategias de mitigación. Estos compuestos son generalmente fibrosos resultado de una extracción de sustancia de mayor calidad para la producción primaria. Dependiendo de la industria, estos compuestos tienen alto porcentaje de proteína, o lípidos, siendo apropiadas por bajo costo, pero con alta variabilidad nutritiva y algunos de ellos desbalances importantes de minerales para el uso en suplementación en las raciones de los rumiantes, como por ejemplo el gluten feed húmedo (GF). En los diferentes ensayos realizados en la EEA San Luis, junto a Frasinelli y otros, (Guzman et al., 2013b, 2014), se obtuvo una alta interacción entre el pH y las dietas suministradas, donde la adición de GF hasta un 100% mantuvo niveles levemente ácido (6-6.5), y la adición de 40% de concentrado (grano de maíz), disminuyó el pH considerablemente, mostrando síntomas de acidosis. La alta efectividad de la fibra del GF sería la responsable del efecto buffer observado, sin embargo, esto afectaría la producción de ácido propiónico y por consiguiente la disminución en la formación de CH₄ por en el animal, de acuerdo a nuestros resultados. La principal desventaja del GF se debe al elevado porcentaje de azufre (S), pudiendo afectar la salud animal. En el rumen se acumula el sulfuro de hidrógeno, producto del metabolismo de microorganismos, traspasando al torrente sanguíneo, pudiendo afectar

a los animales de variadas formas (Gould *et al.*, 2002), como intervenir en la absorción y disponibilidad de otros metales (selenio y cobre, NRC 2001), y también se han asociado a polioencefalomalacia (PEM) (Sager *et al.*, 1990). En el capítulo 6 se tratan estos temas, evidenciando la complejidad de las interacciones entre nutrición, sanidad, productividad y gases de efecto invernadero. Si bien, nuestros resultados se determinaron concentraciones de S mayores a 100 ppm (límite superior del medidor portátil de gas), y mediante tubos detectores con una sensibilidad de 100 a 2000 ppm obtuvimos valores entre 500-1000 ppm, no se observó en ningún ensayo, síntomas de toxicidad. La explicación se atribuye, al efecto del GF sobre el pH del rumen, en condiciones de neutralidad el H₂S se encontraría en equilibrio principalmente en medio acuoso, estas conclusiones se sometieron a consideración de pares en el congreso de Biología Argentina. En general dietas con alto contenido de S que compiten con el precio relativo y valor nutricional con otros alimentos tradicionales de bovinos, empiezan a ser utilizadas por los productores. Varios ensayos combinando este alimento se muestran en el capítulo 5, siendo la finalidad presentar de alternativas de preparados en base a insumos de bajo costo, mostrando como estrategia viable y sustentable el uso de subproductos en la producción bovina, siendo estas especulaciones mérito para mayores investigaciones.

En este marco de sustentabilidad productiva se continúa en el capítulo 7 con el estudio ambiental. Se identifican áreas de riesgo de los sistemas intensivos, se muestra la dinámica de los gases, a través de la determinación de las concentraciones *in situ* (a campo) de CH₄, CO, CO₂ (gases contaminantes) y O₂, como también el efecto del estiércol en los suelos por medio de ensayos *in vitro* en laboratorio, estudiando principalmente el NH₃. Debido a que es posible minimizar las emisiones de CH₄ a través de estrategias alimenticias, pero al mismo tiempo se podría estar aumentando las emisiones de los óxidos de nitrógenos, el cual es 300 más contaminante que CO₂. Por ello, es necesario abordar el tema desde un enfoque sistémico que incluyan los sistemas de manejo sobre el estiércol que varían en las emisiones de N₂O. La disminución del tiempo de almacenamiento y aireación buscan disminuir los procesos de fermentación de los MO. Efecto contrario se da al cubrir el estiércol, cuando las cubiertas son semipermeables, disminuyen la emisión de metano y olor, pero aumentarían las de N₂O que se concentra en los efluentes. En el caso de tratarse de membranas impermeables puede acumularse CH₄ cuya combustión generaría calor o electricidad, siendo los

digestores anaeróbicos una recomendable estrategia de remediación. Las desventajas de este sistema es que requiere una alta inversión de capital, por lo que su aplicación se ve favorecida cuando existen incentivos económicos. Actualmente la provincia de San Luis está avanzando en la temática de energías limpias, recientemente firmando el gobernador un proyecto de ley sobre la temática. Cuando el estiércol se deja sobre superficie se espera menor emisión de N_2O pero se produce gran pérdida como NH_3 . Si bien la incorporación de estiércol reduce la emisión de NH_3 , aumenta la carga bacteriana y materia orgánica, acelerando el metabolismo del suelo, agotando oxígeno desencadenando desnitrificación por ende N_2O . Al utilizar la digestión anaeróbica se reduce la materia orgánica dando como resultados menores emisiones de N_2O (Velthof y Mosquera, 2011). En los capítulos 5 y 7 se muestra como la calidad de la dieta tiene un gran impacto sobre el estiércol (heces y orina) y por lo tanto en la emisión de GEI en función a la condiciones ambientales y manejo. Las raciones bajas en proteína, el agregado de nitrógeno degradable en rumen junto a algo de fibra mejora el consumo en vacas, y de acuerdo a las afirmaciones de Dijkstra y otros (2011). Resulta crítico en los sistemas intensivos, la relación lineal entre CH_4 y consumo (Hristov *et al.*, 2013), evidenciando la bibliografía emisiones de CH_4 y N_2O sustancialmente menores (5%), en animales en pastoreo por su menor consumo.

Actualmente, los estudios se están direccionando para identificar opciones de manejo de mitigación de los diferentes sistemas productivos. La influencia de factores como la calidad de la dieta, nivel de consumo, características del animal y del tipo de actividad sobre la producción de metano, han sido evaluados (Ellis *et al.*, 2010,2012; Yan *et al.*, 2009; Beauchemin, 2011). Sin embargo, los resultados dispares y a veces contradictorios, podría deberse a la falta de relación con el estado fisiológico y nutritivo del animal, características ambientales, etc. Esto es una de las principales desventaja de los modelos de estimación, el no poder representar la combinación de todos los factores, ni diferenciar las eficiencias propias del animal en relación a la categoría, estado de salud y fisiológico. Franks y Hadinghan (2012) afirman que para una eficiente reducción de los GEI correspondiente a la agricultura, la evaluación del impacto de las prácticas de manejo debe realizarse en función al total neto del sistema productivo. Por otro lado, los avances en el conocimiento de las comunidades microbiales ruminales a través de la genómica (Leahy *et al.*, 2013; Attwood *et al.*, 2011) y metagenómica (Hess *et al.*, 2011; Morgavi *et al.*, 2010, 2013) permite una nueva visión para el desarrollo de

estrategias de mitigación. De ellas se habla en el capítulo 8, identificando en forma general dos áreas de intervención, cambio en la dieta y la directa manipulación del ecosistema ruminal. Como se ha ido comentando, las interacciones entre el animal, el entorno y las prácticas de manejo interfieren en la mitigación de los GEI y de la productividad animal. Los efectos de estas prácticas pueden ser claros en ciertas etapas de producción, pero en todo el sistema son difíciles de medir, además suelen ser mutuamente excluyentes. Para asegurar acciones de mitigación de CH₄ entérico eficientes, esta no debe incrementar otros GEI del sistema; para lo cual el ACV presenta la capacidad de predecir dichos impactos (Williams *et al.*, 2014, Zehetmeier *et al.*, 2014). La efectividad sobre la emisión de CH₄, a través de la manipulación de la dieta es significativamente variable debido a la falta de estandarización de las muestras y metodologías, diferencias entre resultados *in vivo* vs. *in vitro*, y principalmente porque la emisión de CH₄ responde de forma cuadrática en relación al nivel de consumo y productividad, siendo dos prácticas efectivas de mitigación. Dentro de las prácticas mitigantes que no presentan discusión encontramos el mejoramiento de la sanidad. Como se observa en capítulo 6, las interacciones entre los distintos factores involucrados en la producción (nutrición, sanidad animal) y los GEI, son difíciles de predecir, ya que impactan en el metabolismo animal y la respuesta dependerá tanto del factor inductor como de las características y estado del inducido. La elección de uno de los componentes principales en diferentes ensayos de la tesis, tuvo como objetivo evaluar la influencia del alto porcentaje de S del gluten feed en la performance animal, en base a que la bibliografía reporta la inducción de muertes de PEM (polioencefalomalacia), fijando un límite de incorporación de este tipo de compuestos (la tolerancia máxima de S es del 0.3%; NRC, 2005). Frasinelli *et al.* (2012) demostraron que los bovinos pueden ser alimentados con mayor concentración de azufre que el recomendado. La hipótesis de este trabajo es que el efecto del pH ruminal sobre las dietas que contienen excedente de S no presentaría incidencia de PEM mientras se mantiene un pH básico. Los resultados del ensayo del capítulo 6 muestran cómo el pH en dietas 100% GF se mantiene en un rango levemente ácido, induciendo la mayor concentración del H₂S a la fase líquida, no confirmando casos de PEM bajo las condiciones en estudio.

En líneas generales, no solo es necesaria la investigación de reducciones posibles, sino también es vital el compromiso del Estado a través de políticas que

gestione su mejor aplicación, en este sentido la provincia es vanguardista en el país. Las implicancias del aumento de temperatura actual de 2°C sobre nivel de la época industrial generada por GEI, y la probabilidad de duplicarse estos gases para el 2050 de acuerdo a diferentes informes (FAO, 2010; IPCC, 2007, IAASTD, 2008) concuerdan en el peligro del cambio climático, determinando la necesidad de la reducción de la emisiones de los GEI. Nuestro aporte en la temática, es a través de esta tesis, la cual presenta una disgregada y compresiva evaluación de las emisiones del sector ganadero de la provincia de San Luis, generando el primer inventario de la provincia, siendo un punto de partida para continuar con análisis más detallados de los sistemas productivos (casos), permitiendo un mayor entendimiento de las emisiones, desarrollando una técnica para la medición de gases *in vivo*, y así poder evaluar estrategias nutritivas para la disminución de formación de CH₄. Debemos considerar la importancia del rol nutricional en la generación de los productos cárnicos, que junto al manejo de los animales, son estrategias de mitigación efectiva, siempre que se acompañen de la adaptación de tecnologías.

CONCLUSIÓN GENERALES

En el mundo de la multidisciplinariedad, inteligencia colectiva y de la máxima información, tenemos que empezar cuanto antes a crear sostenibilidad, para ello primero debemos adaptarnos y buscar soluciones al tema del cambio climático, que se evidencia, tanto el aumento de las temperaturas como la irregularidad de las precipitaciones o la frecuencia de episodios climáticos extremos. En el último informe del IPCC (5º) se analiza los efectos en la actualidad, a medio plazo (entre 2030 y 2040) y largo plazo (2080-2100), basado en proyecciones actuales. Se considera que el cambio climático provocará un incremento de las restricciones de agua debido a la significativa reducción de la extracción de los ríos y de acuíferos subterráneos combinado con el aumento de la demanda para irrigación, energía e industria y uso doméstico. Este proceso se intensificará en determinadas áreas del mundo debido a una mayor pérdida de agua a través de la evaporación natural. El aumento de las olas de calor, podría tener un impacto negativo en la salud y el bienestar público, además de una mayor probabilidad de sequías e inundaciones en las zonas costeras y cuencas de ríos a causa de la urbanización creciente, el aumento del nivel del mar y la erosión de la costa. El IPCC ha alertado de que la seguridad alimentaria es un aspecto que desata especial preocupación: las previsiones contemplan pérdidas de hasta el 25% en las cosechas de maíz, arroz y trigo en el periodo que se extiende hasta 2050. Actualmente, no hay números finales de pérdidas pero la cosecha agrícola de la campaña 2014/15 en la pampa húmeda por inundaciones de lotes, superaría esta cifra. Por otro lado, la producción y el consumo insostenible está provocando el cambio climático, la contaminación de hábitats terrestres y marinos y la transformación de los ecosistemas en zonas artificiales para satisfacer las demandas de la sobreproducción, lo cual nos llevaría al caos sino son abordadas con sensibilidad y conocimiento. Además, en el informe se advierte del incremento de las migraciones vinculadas a las condiciones climáticas, así como los conflictos y las amenazas a la seguridad nacional derivadas de las mismas. Ello nos obliga a aplicar soluciones que creen sostenibilidad. Además de emitir menos CO₂ o detener la pérdida de biodiversidad, buscar soluciones con resiliencia, es decir, ser capaces de responder de una forma rápida y de una forma inteligente a las perturbaciones que se van a producir. Buscar soluciones basadas en la

naturaleza y no en la compra de bonos de carbono, que sirven de ayuda a nivel social y económico, no representan soluciones reales. A través del conocimiento y su extensión la sociedad será cada vez más exigente con las instituciones y empresas, demandando que se tomen más en serio estos procesos cruciales y en definitiva se empiece a actuar “ya” creando sostenibilidad.

BIBLIOGRAFÍA

- ACFA - Alberta Cattle Feeders' Association y AAFRD – ALBERTA. Agriculture; Food and Rural Development. 2002. Beneficial Management Practices - Environmental Manual for Feedlot Producers in Alberta. 45-88. [http://www1.agric.gov.ab.ca/\\$department/deptdocs.nsf/all/epw5837](http://www1.agric.gov.ab.ca/$department/deptdocs.nsf/all/epw5837)[consultado 2/8/2015]
- Aguilera, J. y Prieto C. 1991. Methane production in goats given diets based lucerne hay and barley. Arch. Anim. Nutr. 41: 77-82
- Aiple, P.; Steingass, H. y Menke, K.H., 1992. Suitability of a buffered faecal suspension as the inoculum in the Hohenheim gas test. 1. Modification of the method and its ability in the prediction of organic matter digestibility and metabolizable energy content of ruminant feeds compared with rumen fluid as inoculum. J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. 67: 57–66.
- Ammar, H.; López, S.; Andrés, S.; Ranilla, M.; Bodas, R. y González, J. 2008. *In vitro* digestibility and fermentation kinetics of some browse plants using sheep or goat ruminal fluid as the source of inoculum. Animal Feed Science and Technology, 147: 90-104.
- Amon, B.; Kryvoruchko, V.; Amon T. y Zechmeister-Boltenstern, S. 2006. Methane, nitrous oxide and ammonia emissions during storage and after application of dairy cattle slurry and influence of slurry treatment. Agric. Ecosyst. Environ. 112: 153–162.
- ANKOM Technology All Rights Reserved. 2052 O'Neil Road, Macedon NY 1450. <https://www.ankom.com> [consultado 2012, 2014, 2015]
- AOAC. 2006/1990. Official Methods of Analysis, Association of Official Analytical Chemists, Arlington, Virginia.
- Arogo, J.; Westerman, P. y Liang, Z. 2003. Comparing ammonium ion dissociation constant in swine anaerobic lagoon liquid and deionized water. Transactions of the ASAE. 46: 1415-1419.
- Atkinson, D. y Watson, C. 1996. The environmental impact of intensive systems of animal production in the lowlands. An. Sci. 63: 353-361.

- Attwood, G.; Altermann, E.; Kelly, W.; Leahy, S.; Zhang, L. y Morrison, M. 2011. Exploring rumen methanogen genomes to identify targets for methane mitigation strategies. *Animal Feed Science and Technology*, 166: 65–75.
- Attwood, T.; Kelly, J.; Altermann, E.; Moon, C.; Leahy, S. y Cookson, A. 2008. Application of rumen microbial genome information to livestock systems in the postgenomic era. *Aust. J. Exp. Agric.* 48: 695-700.
- Ayroud, M.; Popp, J.; Vanderkop, M.; Yost, G.; Haines, D.; Majak, W.; Karren, D.; Yanke, J. y McAllister, T. 2000. Characterization of acute interstitial pneumonia in cattle in southern Alberta feedyards. *Can. Vet. J.* 41: 547-554.
- Bannink, A.; Van Schijndel, M. y Dijkstra, J. 2011. A model of enteric fermentation in dairy cows to estimate methane emission for the Dutch National Inventory Report using the IPCC Tier 3 approach. *Anim. Feed Sci. Technol.* 166: 603-618.
- Bannink A.; Smits M.; Kebreab E.; Mills J.; Ellis J.; Klop A.; France J. y Dijkstra J. 2010. Simulating the effects of grass land management and grass ensiling on methane emission from lactating cows. *J. Agric. Sci.* 148: 55-72.
- Bannink, A.; Dijkstra, J.; Mills, A.; Kebreab, E. y France, J. 2005. Nutritional strategies to reduce enteric methane formation in dairy cows. In: *Emissions from European Agriculture*. Eds. T. Kuczyski, U.; Dämmgen, J.; Webb y Myczko. Wageningen Academic Publishers. Netherlands. 367-376
- Beauchamp R.; Bus, J.; Popp, J.; Boreiko, C. y Andjelkovich, D. 1984. A critical review of the literature on hydrogen sulfide toxicity. *Critical Reviews in Toxicology*. 13: 25-97.
- Beauchemin, K.; Janzen, H.; Little, S.; McAllister, T. y McGinn, S. 2011. Mitigation of greenhouse gas emissions from beef production in western Canada Evaluation using farm-based life cycle assessment. *Anim. Feed Sci. Technol.* 166: 663-677.
- Beauchemin, K.; McAllister, T. y McGinn, S. 2008. Dietary mitigation of enteric methane from cattle. *CAB Reviews: perspectives in agriculture, veterinary science. Nutr. Nat. Res.* 4: 1-18.
- Beauchemin, K. y McGinn, S. 2006. Enteric methane emissions from growing beef cattle as affected by diet and level of intake. *Can. J. Anim. Sci.*, 86: 401–408

- Belyea, R.; Rausch, K.; Clevenger, T.; Singh, V.; Johnston, D. y Tumbleson, M. 2010. Sources of variation in composition of DDGS. *Animal Feed Science and Technology*. 159: 122-130.
- Benchaar, C.; Rivest, C.; Pomary-Chiquette, J. 1998. Prediction of methane production from dairy cows using existing mechanistic models and regression equations. *J. Anim. Sci.* 76: 617-627.
- Berra, G.; Finste L.; Castuma E. y Maldonado V. 2000. Ministerio de Desarrollo Social y Medio Ambiente. Secretaría de Desarrollo Sustentable y Política Ambiental: Reducción y Opciones de Mitigación de Emisiones de Metano provenientes de Ganado Bovino.
http://www.medioambiente.gov.ar/File/reduccion_de_metano[Consultado 16/10/2010]
- Beukes, P.; Gregorini, P.; Romera, A.; Levy, G. y Waghorn, G. 2010. Improving production efficiency as a strategy to mitigate greenhouse gas emissions on pastoral dairy farms in New Zealand. *Agric. Ecosyst. Environ.* 136: 358-365.
- Bevans, D.; Beauchemin, K. y Schwartzkopf-Genswein, K. 2005. Effect of rapid or gradual grain adaptation on subacute acidosis and feed intake by feedlot cattle. *J Anim Sci.* 83: 1116-1132.
- Blaxter, K. y Clapperton, J. 1965. Prediction of the amount of methane produced by ruminants. *Br. J. Nutr.* 19: 511-522.
- Blood, D. y Radostits, O. 1992. *Medicina Veterinaria*. 7ma, ed. Editorial Interamericana S.A. de C.V. México. 1532-1539.
- Bloomfield, R.; Garner, G. y Muhrer, M. 1960. Kinetics of urea in sheep. *J. Anim. Sci.* 19: 1248-1260.
- Boadi, D. y Wittenberg, K. 2002. Methane production from dairy cattle and beef heifers feed forages differing in nutrient density using the sulphur hexafluoride (SF6) technique. *Can. J. Anim. Sci.* 82: 201-206.
- Bodman, G. y Koelsch. 1996. Feedlot Abandonment Recommended Procedures.
<http://www.ianrpubs.unl.edu/epublic/pages/publicationD.jsp?>[consultado 12/10/2010].
- Bottcher, R. 2001. An environmental nuisance: Odor concentrated and transported by dust. *Chemical Senses*. 26: 327-331.
- Boxal, A.; Fogg, L.; Blackwell, P.; Kay, P. y Pemberton, E. 2004. Veterinary medicines in the environment. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 180: 1-91.

- Bradley, A; Leavitt, W. y Johnston, D. 2011. Revisiting the dissimilatory sulfate reduction pathway. *Geobiology*. 9: 446-457.
- Breukink, H.; Wensing, T. y Wentink, G. 1992. Disorders in the dairy cow as a consequence of production, pp 123-135 In: Proc. 8th. Intern. Conf. on Prod. Diseases in Farm Animals, Univ. of Berne, Switzerland. 24-27.
- Britton, R. y Stock, R. 1989. Acidosis: Continual problem in cattle fed high grain diets. En: Proceedings of Cornell Nutrition Conference for Feed Manufactures. Cornell University.
- Buddle, B.; Denis, M.; Attwood, G.; Altermann, E.; Janssen, P.; Ronimus, R.; Pinares-Patiño, C.; Muetzel, S. y Wedlock, D. 2011. Strategies to reduce methane emissions from farmed ruminants grazing on pasture. *Vet. J.* 188: 11–17.
- Calsamiglia S; Bach, A.; de Blas, C.; Fernández, C. y García-Rebollar, P. 2009. Necesidades nutricionales para rumiantes de leche. Normas FEDNA. Ed. Peninsulares, Madrid. 89.
- Cambra-López, M.; García Rebollar P.; Estellés F. y Torres A. 2008. Estimación de las Emisiones de los Rumiantes en España: el Factor de Conversión de Metano. *Archivos de zootecnia*. 57: 89-101.
- Capper, J. y Cady, R. 2012. A comparison of the environmental impact of Jersey compared with Holstein milk for cheese production. *J. Dairy Sci.* 95: 165-176.
- Capper, J.; Castañeda-Gutiérrez, E.; Cady, R. y Bauman, D. 2008. The environmental impact of recombinant bovine somatotropin (rbST) use in dairy production. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105: 9668–9673.
- Casey, J. y Holden, N. 2006. Quantification of GHG emissions from sucker-beef production in Ireland. *Agricultural Systems*. 90: 79-98.
- Cederberg, C. y Stadig, M. 2003. System expansion and allocation in life cycle assessment of milk and beef production, *Int. J. Life Cycle Assess.* 8: 350-356.
- Chilliard, Y. y Ferlay, A. 2004. Dietary lipids and forages interactions on cow and goat milk fatty acid composition and sensory properties. *Reprod. Nutr. Dev.* 44: 467-492.
- Chiumenti, A.; Chiumenti, R.; Diaz, L.; Savage, G.; Eggerth, L. y Goldstein, N. 2005. Modern composting technologies. *Biocycle. Journal of Composting Organics Recycling*. Singapore. 96.

- Church, C.D. 1993. El rumiante. Fisiología digestiva y Nutrición. Editorial Acribia S.A. Zaragoza. España. 392.
- CMNUCC, Convención Marco de las Naciones Unidas sobre el Cambio Climático.1992.
https://unfccc.int/files/essential_background/background_publications_htmlpdf/application/pdf/convsp.pdf [Consultado 15/10/2014]
- Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio. Protocolo para el uso de animales de investigación científica, 2014.
http://www.fcv.unlp.edu.ar/index.php?option=com_content&view=article&id=2694&Itemid=1764 [Consultado 10/2/2015]
- Cone, J.; van Gelder, A. y Bachmann, H. 2002. Influence of inoculum source on gas production profiles. Anim. Feed Sci. Technol. 99:221-231.
- Cone, J. y van Gelder, A. 1999. Influence of protein fermentation on gas production profiles. Anim. Feed Sci. Technol. 76: 251-264
- Crosson, P.; Shalloo, L.; O'Brien, D.; Lanigan, G.; Foley, P.; Boland, T. y Kenny, D. 2011. A review of whole farm systems models of greenhouse gas emissions from beef and dairy cattle production systems. Anim. Feed Sci. Technol. 166: 29-45.
- Cummings, A.; Gould, D.; Caldwell, D. y Hamar D. 1995. Rumen microbial alterations associated with sulfide generation in steers with dietary sulfate-induced polioencephalomalacia. Am. J. Vet. Res. 56: 1390-1395
- De Haas, Y.; Windig, J.; Calus, M.; Dijkstra, J.; De Haan, M., Bannink, A. y Veerkamp, R. 2011. Genetic parameters for predicted methane production and potential for reducing enteric emissions through genomic selection. J. Dairy Sci. 94: 6122-6134.
- Decreto N° 6314- MI y RI- 2005. Programa Protocolo de Kyoto. San Luis.
<http://ministerios.sanluis.gov.ar/canal.asp?idCanal=8170>[Consultado 16/10/2014]
- Dewhurst, R.; Evans, N.; Scollan, J.; Moorby, R.; Merry y Wilkins, J. 2003. Comparison of grass and legume silages for milk production. *In vivo* and *in sacco* evaluations of rumen function. J. Dairy Sci. 86: 2612-2621
- Di Lorenzo, N y Galyean, M. 2010. Applying technology with newer feed ingredients- Do the paradigms apply. J. Anim. Sci. 88: 123-132.
- Di Lorenzo, N. 2013. Uso de subproductos de la producción de etanol en nutrición animal. En 4º Jornada Nacional de Forrajes Conservados. Ediciones INTA.

- Di Rienzo J.; Casanoves F.; Balzarini M.G.; Gonzalez L.; Tablada M. y Robledo C.W. InfoStat versión 2015. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. <http://www.infostat.com.ar>[Consultado 10/1/2015]
- Di, H. y Cameron, K. 2012. How does the application of different nitrification inhibitors affect nitrous oxide emissions and nitrate leaching from cow urine in grazed pastures? *Soil Use Manage.* 28: 54–61.
- Dijkstra, J.; Oenema, O. y Bannink, A. 2011. Dietary strategies to reducing N excretion from cattle: implications for methane emissions. *Curr. Opin. Environ. Sustainability* 3: 414-422.
- Dijkstra, J.; Kebreab, E.; Bannink, A.,;France, J. y López, S. 2005. Application of the gas production technique to feed evaluation systems for ruminants. *Animal Feed Sci. Tech.* 124: 561.
- Dijkstra, J.; Neal, H.; Beever, D. y France, J. 1992. Simulation of nutrient digestion, absorption and outflow in the rumen: model description. *J. Nutrition* 122: 2239-2256.
- Doster, A.; Subramaniam, S.; Yhee, J.; Kwon, B.; Yu C. y Kwon S. 2010. Distribution and characterization of IL-10-secreting cells in lymphoid tissues of PCV2-infected pigs. *J. Vet. Sci.* 11: 177-183.
- Drewnoski, E.; Richter, E. y Hansen, S. 2013. Dietary sulfur concentration affects rumen hydrogen sulfide concentrations in feedlot steers during transition and finishing. *J. Anim. Sci.* 90: 4478-4486.
- Drewnoski, M.; Doane, P. y Hansen, S. 2014. Ferric citrate decreases ruminal hydrogen sulphide concentrations in feedlot cattle fed diets high in sulphate. *Br. J. Nutr.* 6: 4389-4403.
- Eckard, R.; Grainger, C. y Klein, C. 2010. Options for the abatement of methane and nitrous oxide from ruminant production: A review. *Livestock Sci.*130: 47-56.
- El Shaer, H.; Omed, H.; Chamberlain, A. y Axford, R. 1987. Use of faecal organisms from sheep for he in vitro determination of digestibility. *J. Agric. Sci. Camb.* 109: 257–259.
- Elizalde, J. y Riffel, S. 2015. El costo oculto de la ineficiencia. <http://www.elizalderiffel.com.ar/>[Consultado 1/2/2015]

- Ellis, J.; Dijkstra, J.; Bannink, A.; Kebreab, E.; Hook, S.; Archibeque, S. y France, J. 2012. Quantifying the effect of monensin dose on the rumen volatile fatty acid profile in high-grain fed beef cattle. *J. Anim. Sci.* 10: 2527-3966.
- Ellis, J.; Bannink, A.; France, J.; Kebreab, E. y Dijkstra, J. 2010. Evaluation of enteric methane prediction equations for dairy cows used in whole farm models. *Glob. Change Biol.* 16: 3246-3256.
- Ellis, J.; Dijkstra, J.; Kebreab, E.; Bannink, A.; Odongo, N.; McBride, B. y France, J. 2008. Aspects of rumen microbiology central to mechanistic modelling of methane production in cattle. *J. Agric. Sci., Camb.* 146: 213-233.
- Eschenlauer, S.; McKain, N.; Walker, N.; McEwan, N.; Newbold, C. y Wallace, R. 2002. Ammonia production by ruminal microorganisms and enumeration, isolation, and characterization of bacteria capable of growth on peptides and amino acids from the sheep rumen. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 4925–4931.
- FAO (Organización de la Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura). 2011a. Successes and failures with animal nutrition practices and technologies in developing countries. En H.P.S. Makkar, ed. Actas de la conferencia electrónica de la FAO, FAO Animal Production and Health Proceedings. N°11. Roma, Italia.
- FAO (Organización de la Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura). 2011b. Quality assurance for animal feed analysis laboratories. FAO Animal Production and Health Manual N° 14. Roma, Italia.
- FAO (Organización de la Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura). 2006a. Livestock's Long Shadow. Environmental effects and options. Rome, Italia. <http://www.virtualcentre.org/> [Consultado 15/10/2014]
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). 2006b. Agricultura Mundial entre los años 2030/2050. Roma, Italia. <http://www.fao.org/docrep/> [Consultado 16/5/2014]
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). 2004. El Estado Mundial de Agricultura y la Alimentación, 2003-2004. La biotecnología agrícola: ¿una respuesta a las necesidades de los pobres? Roma, Italia.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). 2003. World Agriculture: Towards 2015/2030. An FAO Perspective. Rome, Italia.
- Firkins, J. y Yu, Z. 2006. Characterisation and quantification of the microbial populations in the rumen. En K. Sejrsen, T. Hvelplund y M.O. Nielsen, eds.

Ruminant Physiology, Digestion, Metabolism and Impact of Nutrition on Gene Expression, Immunology and Stress. Wageningen Academic Publishers: 19-54.

- Firkins, J.; Eastridge, M.; St-Pierre, N. y Noftsker, S. 2001. Effects of grain variability and processing on starch utilization by lactating dairy cattle. *J. Anim. Sci.* 79: 218-238.
- Firkins, J.; Berger y Fahey. 1985. Evaluation of wet and dry distillers grains and wet and dry corn gluten feeds for ruminants. *J. Anim. Sci.* 60:847.
- Flachowsky, G. 2011. Carbon-footprints for food of animal origin, reduction potentials and research need, *Journal of Applied Animal Research* 39: 2–14.
- Fondevila, M. y Barrios, A. 2001. The gas production technique and its application to the study of the nutritive value. *Cuban J. Agric. Sci.* 35: 197-205.
- France, J.; Theodorou, M.; Lowman, R. y Beever, D. 2000. Feed evaluation for animal production. In: *Feeding systems and feed evaluation models*.
- Franks, J. y Hadingham, B. 2012. Reducing greenhouse gas emissions from agriculture: avoiding trivial solutions to a global problem. *Land Use Policy.* 29: 727–736.
- Frasinelli, C.; Guzman, L.; Frigerio, K.; Riedel, J.; Bengolea, A. y Veneciano, J. 2014. Recría parcial de novillitos con alimentación exclusiva de gluten-feed húmedo. *Revista Argentina de Producción Animal Vol 34 Supl. 1:* 416.
- Frasinelli, C.; Guzmán, L.; Riedel, J.; Frigerio, K., Veneciano, J. y Bengolea, A. 2014. Efecto de la suplementación con fibra sobre la performance de novillitos alimentados con gluten-feed húmedo. *Revista Argentina de Producción Animal Vol 34 Supl. 1:* 415.
- Frasinelli, C.; Riedel, J.; Veneciano, J.; Guzman, L. y Bertelli. 2012. Consumo y digestibilidad in vivo de dietas con alta inclusión de gluten-feed húmedo. *Rev. Arg. Prod. Anim. Vol 32 Sup 1:* 181
- Frasinelli, C.; Veneciano J.; Belgrano-Rawson A. y Frigerio K. 2003. *Sistemas Extensivos de Producción Bovino: Productividad y Rentabilidad. Con las Metas Claras.* INTA, EEA San Luis. Villa Mercedes, S L, Argentina. 141-158.
- Fundación Bariloche. 2005. *Inventario Nacional de la República Argentina, de fuentes de emisiones y absorciones de Gases de Efecto Invernadero, no controlados por el protocolo de Montreal. Inventario correspondiente al año 2000 y revisión de los inventarios 1990, 1994 y 1997.*

- Garnett, T. 2009. Livestock-related greenhouse gas emissions: Impacts and options for policy makers. *Environmental Science and Policy*. 12: 491–503
- Gerber, J.; Steinfeld, H.; Henderson, B.; Mottet, A.; Opio, C.; Dijkman, J.; Falcucci, A. y Tempio, G. 2013. Tackling climate change through livestock: A global assessment of emissions and mitigation opportunities. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Rome.
- Getachew, G.; Robinson, P.; De Peters, E. y Taylor, S. 2004. Relationships between chemical composition, dry matter degradation and in vitro gas production of several ruminant feeds. *Anim. Feed Sci. Technol.* 111: 57-71.
- Getachew, G.; Blümmel, M.; Makkar, H. y Becker, K. 1998. In vitro measuring techniques for assessment of nutritional quality of feeds: a review. *Anim. Feed Sci. Technol.* 72: 261-281.
- Gibbs, M. y Johnson, D. 1993. Livestock Emissions. En: International Methane Emissions, US Environmental Protection Agency, Climate Change Division, Washington, D.C., U.S.A
- Gil, S.; Orlando A. y Herrero, M. 2006. Indicadores de riesgo ambiental en sistemas agropecuarios con engorde a corral. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 26: 330-332.
- Glasser, F.; Schmidely, P.; Sauvant, D. y Doreau, M. 2008. Digestion of fatty acids in ruminants: a meta-analysis of flows and variation factors: 2. C18 fatty acids. *Animal*: 691-704.
- Goering, H. y Van Soest, P.J. 1970. Forage fiber analysis (aparatos, procedimientos y aplicaciones). USDA Agricultural Research Service. Handbook 379.
- Google Earth. <http://www.google.com/intl/es/earth/index.html> [Consultado 10/5/2013]
- Gould D.; Dargatz, D.; Garry, F.;Hamar, D. y Ross, P. 2002. Potentially hazardous sulfur conditions on beef cattle ranches in the United States. *J. Am. Vet. Med.* 221: 673-677.
- Gould D.H. 2000. Update on sulfur-related polioencephalomalacia. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.*16: 481-496.
- Gould, D.H. 1998. Polioencephalomalacia. *J. Anim. Sci.* 76: 309-314.
- Grainger, C. y Beauchemin, K. 2011. Can enteric methane emissions from ruminants be lowered without lowering their production? *Anim. Feed Sci. Technol.* 166: 308–320.

- Grainger, C.; Williams, R.; Clarke, T.; Wright, A. y Eckard, R. 2010. Supplementation with whole cottonseed causes long-term reduction of methane emissions from lactating dairy cows offered a forage and cereal grain diet. *J. Dairy Sci.* 93: 2612–2619
- Groot, J.; Cone, J.; Williams, B.; Debersaques, F. y Lantinga, E. 1996. Multiphasic analysis of gas production kinetics for *in vitro* fermentation of ruminant feeds. *Anim. Feed Sci. Technol.* 64: 77-89.
- Guzman, L.; Frigerio, K. y Sager, R. 2014. Comparación de modelos matemáticos en la producción de gas *in vitro*. In Congreso Argentino de Producción Animal. 37. Joint Meeting ASAS-AAPA. 2. Congreso de la Sociedad Chilena de Producción Animal. 39.
- Guzmán, L.; Frasinelli, C. y Sager R. 2014. Effect of 100 % gluten feed diet on ruminal parameter. *Biocell* 2014.
- Guzmán, L; Sager, R. 2013. Inventario de metano entérico de los sistemas de producción de carne para San Luis en el año 2009. *RIA. Revista investigación agropecuario.* Ciudad Autónoma de Buenos Aires. 39: 88-94.
- Guzmán, L.; Bengolea, A.; Page, W.; Frasinelli, C. y Sager, R. 2013. Dietas rápidamente fermentecibles: Monitoreo *in vivo* de pH ruminal. *Rev. Arg. Prod. Anim.* Vol 33 Sup 1: 189.
- Guzmán, M. L. 2011. Comparación de inóculos microbianos en la determinación de la digestibilidad *in vitro*. Universidad Nacional de Córdoba. Tesis de Especialización en Alimentación Bovina. <http://hdl.handle.net/11086/1688> [consultado 12/6/2012]
- Hales, K.E., Cole, N.A. y MacDonald, J.C. 2012. Effects of corn processing method and dietary inclusion of wet distillers grains with solubles on energy metabolism, carbon-nitrogen balance, and methane emissions of cattle. *J. Anim. Sci.* 90:3174–3185.
- Hammond, A.; Carlson, J. y Breeze, R. 1979. Monensin and the prevention of tryptophan-induced acute bovine pulmonary edema and emphyse. *Science* 201:153-155.
- Hammond, K.; Hoskin, S.; Burke, J.; Waghorn, G.; Koolaard, J. y Muetzel, S. 2011. Effects of feeding fresh white clover (*Trifolium repens*) or perennial ryegrass

(*Lolium perenne*) on enteric methane emissions from sheep. Anim. Feed Sci. Technol. 166: 398–404.

- Hammond, K.; Muetzel, S.; Waghorn, G.; Pinares-Patino, S; Burke, L. y otros. 2009. The variation in methane emissions from sheep and cattle is not explained by the chemical composition of ryegrass. Proceedings of the 69th Conference of the New Zealand Society of Animal Production. Canterbury, New Zealand. New Zealand Society of Animal Production. 69: 174-178.
- Harris, B. y Kolver, E. 2001. Review of holsteinization on intensive pastoral dairy farming in New Zealand. J. Dairy Sci. 84. E56–E61.
- Hatch, D; Goulding, K. y Murphy. 2002. Nitrogen en: Haygarth, Agriculture, hydrology and water quality. CAB International.7-27.
- Heber, A.; Ni, J. y Lim, T. 2002. Odor flux measurements at a facultative swine lagoon stratified by surface aeration. Applied Engineering in Agricul. 18: 593-602.
- Hegarty, R.; Goopy, J.; Herd, R. y McCorkell, B. 2007. Cattle selected for lower residual feed intake have reduced daily methane production. J. Anim. Sci. 85: 1479–1486.
- Herd, R. y Arthur, P. 2009. Physiological basis for residual feed intake. J. Anim. Sci. 87: E64–E71.
- Hess, M.; Sczyrba, A.; Egan, R.; Kim, T.; Chokhawala, H.; Schroth, G.; Luo, S.; Clark, D.; Chen, F.; Zhang, T.; Mackie, R.; Pennacchio, L.; Tringe, S.; Visel, A; Woyke, T; Wang, Z. y Rubin, E. 2011. Metagenomic discovery of biomass-degrading genes and genomes from cow rumen. Sci. 331: 463–467.
- Hindrichsen, I.; Wettstein, A.; Machmuller. H. y Kreuzer, M. 2006. Methane emission, nutrient degradation and nitrogen turnover in dairy cows and their slurry at different milk production scenarios. IGES, Hayama, Kanagawa, Japan. <http://www.ipcc-nggip.iges.or.jp>. [consultado 25/10/2015]
- Hobbs, J.; Misselbrook, H. y Pain, F. 1995. Assessment of odours from livestock wastes by a photoionization detector, an electronic nose, olfactometry and gas chromatography–mass spectrometry. J. Agric. Eng. Res. 60: 137-144.
- Hoeksma, P.; Verdoes, N.; Oosthoek, J. y Voermans, J. 1992. Reduction of ammonia volatilization from pig houses using aerated slurry as recirculation liquid. Livest. Prod. Sci. 31: 121–132.

- Holden L.A., 1999. Comparison of methods of in vitro dry matter digestibility for ten feeds. *J. Dairy Sci.*, 82, 1791-1794.
- Hristov, N.; Lee, J.; Meinen, R.; Montes, F.; Firkins, J.; Rotz, A.; Dell, C.; Adesogan, A.; Yang, W.; Tricarico, J.; Kebreab, E.; Waghorn, G.; Dijkstra, J.; Oosting, S. y otros. 2013. Mitigation of greenhouse gas emissions in livestock production: A review of technical options for non-CO₂ emissions. P.J. Gerber, B. Henderson, H.P.S. Makkar. Ed. FAO Animal Production and Health. Rome, Italy. 177.
- Hristov, N.; Hanigan, M.; Cole, A.; Todd, R.; McAllister, T.; Ndegwa, P. y Rotz, A. 2011. Ammonia emissions from dairy farms and beef feedlots: A review. *Can. J. Anim. Sci.* 91: 1–35.
- Hristov, N.; McAllister, T. y Cheng, J. 1998. Stability of exogenous polysaccharide-20 degrading enzyme in the rumen. *Animal Feed Science and Technology* 76: 165-172.
- Hungate, R.E. 1966. The Rumen and Its Microbes. Bacteriocins of *Streptococcus bovis*. *Can. J. Microbiol.* 22: 1040-1047
- IAASTD: Evaluación Internacional del Papel del Conocimiento, la Ciencia y la Tecnología en el Desarrollo Agrícola. 2008. Armbrecht, I.; Cetrángolo, H.; Gonzales, T.; Ivette, P.
www.unep.org/dewa/agassessment/.../Global_SDM_050508_Spanish.pdf [Consultado 01/06/2014].
- IBM SPSS Statistics 19. www.spss.com/[Consultado 30/6/2014]
- IPCC. Cambio Climático 2007: Informe de Síntesis. Contribución de los Grupos de trabajo I, II y III al Cuarto Informe de evaluación del Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático (Equipo de redacción principal: Pachauri, K y Reisinger, A.). Ginebra, Suiza.
http://www.ipcc.ch/pdf/assessment-report/ar4/syr/ar4_syr_sp.pdf [Consultado 30/3/2014]
- IPCC, Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático. 2006. Directrices del IPCC de 2006 para los inventarios nacionales de gases de efecto invernadero. Volumen 4: Agricultura, silvicultura y otros usos de la tierra
Capítulo 10: Emisiones resultantes de la gestión del ganado y del estiércol. Capítulo 11: Emisiones de N₂O de los suelos gestionados y emisiones de CO₂ derivadas de la

aplicación de cal y urea.

http://www.ipccnggip.iges.or.jp/public/2006gl/spanish/pdf/4_Volume4/V4_10_Ch10_Live_stock.pdf. [Consultado 28/3/2012]

- IPCC, Orientación del IPCC sobre las buenas prácticas y la gestión de la incertidumbre en los inventarios nacionales de gases de efecto invernadero 2000. <http://www.ipcc-837-nggip.iges.or.jp/public/gp/english/index.html> [Consul. 5/5/2012]
- IPCC, Orientación sobre las buenas prácticas para uso de la tierra, cambio de uso de la tierra y silvicultura (UTCUTS) (GPG-LULUCF). 2003. <http://www.ipcc-nggip.iges.or.jp/public/gpglulucf/gpglulucf.html>. [Consul. 20/8/2012]
- Isaacson, H.; Hinds F.; Bryant, M. y Owens, F. 1975. Efficiency of energy utilization by mixed rumen bacteria in continuous culture. J. Dairy Sci. 58: 1645-1659.
- Jaakola, S. y Huhtanen, P. 1993. The effects of forage preservation method and proportion of concentrate on nitrogen digestion and rumen fermentation in cattle. Grass Forage. Sci., 48: 146-154.
- Jeffrey, M.; Duff, J. y Higgins, R. 1994. Polioencephalomalacia associated with ingestion of ammonium sulfate by sheep and cattle. Vet Rec 134: 343-348.
- Jenkins, T.; Wallace, R.; Moate, P. y Mosley, E. 2008. Board-Invited Review: Recent advances in biohydrogenation of unsaturated fatty acids within the rumen microbial ecosystem. J. Anim. Sci. 86: 397-412.
- Johnson, D.; Phetteplace, H. y Seidl, A. 2002. Methane, nitrous oxide and carbon dioxide emissions from ruminant livestock production systems. In Greenhouse gases and animal agriculture. Amsterdam. The Netherlands: Elsevier. 77-85.
- Johnson, K. y Johnson D. E. 1995. Methane emission from cattle. J. Anim. Sci. 73:2483-2492.
- Johnson, K.; Huyler, H.; Westberg, B.; Lamb y Zimmerman, P. 1994. Measurement of methane emissions from ruminant livestock using a SF₆ tracer technique. Environ. Sci. Technol. 28: 359-362
- Jones, R. y Barnes, P. 1996. *in vitro* digestibility assessment of tropical shrubs legumes using rumen fluid or faecal fluid as the inoculum source. Trop. Grassl., 30, 374-377.

- Jordan, E.; Lovett, D.; Monahan, J.; Callan, J.; Lynn, B. y O'Mara, P. 2006. Effect of refined coconut oil or copra meal on methane output and on intake and performance of beef heifers. *J. Anim. Sci.* 84: 162.
- Kawas, J.; Lopes, D.; Danelon y Lu, C. 1991. Influence of forage to concentrate ratio on intake, digestibility, chewing and milk production in dairy cows. *Small Rum. Res.*, 4: 11-18.
- Kawashima, H.; Minami, H.; Hanai y Fushimi, A. 2006. Volatile organic compound
- Keeney, D. y Hatfield, J. 2001. The nitrogen cycle, historical perspective and current, and potential future concerns. In: Follett, R.; Hatfield, J. eds. *Nitrogen in the environment: Sources, problems and management.* Elsevier Sci. 3-6.
- Kerr, L. y Linnabary, R. 1989. A review of interstitial pneumonia in cattle. *Vet. Hum. Toxicol.* 31: 247-254.
- Key, N. y Tallard, G. 2008. *Methane Emissions from Livestock: Policy issues and analysis.* United Nations, Department of Agriculture; Animal Production and Health Division.
- Khafipour, E.; Li, S.; Plaizier, J. y Krause, D. 2009. Rumen microbiome composition determined using two nutritional models of subacute ruminal acidosis. *Appl Environ Microbiol.* 75: 7115-7124.
- Kingston-Smith, A.; Edwards, J.; Huws, S.; Kim, E. y Abberton, M. 2010. Plantbased strategies towards minimising 'livestock's long shadow'. *Proc. Nut. Soc.* 69: 613-620.
- Kinsman, R.; Sauer, F. Jackson, H. y Wolynetz, M. 1995. Methane and carbon dioxide emissions from dairy cows in full lactation monitored over a six month period. *J. Dairy Sci.* 78: 2760-2766.
- Kirchgessner, M.; Kreuzer, M.; Müller, L. Windisch, W. 1990. Release of methane and of carbon dioxide by the pig. *Agribiol. Res.* 44:103-113.
- Klasing, K.; Goff, J. y Greger, J. 2005. *Mineral tolerance of animals.* The National Academies Press, Washington DC, USA. 372-385.
- Koning y Liebich .2005. *Anatomía de los Animales Domésticos.* Tomo II. Editorial Médica Panamericana.
- Krehbiel, C.; Rust, S.; Zhang, G. y Gilliland, S. 2003. Bacterial direct-fed microbials in ruminant diets: Performance response and mode of action. *J. Anim. Sci.* 81: 120-132.

- Kreuzer, M. y Hindrichsen, I. 2006. Methane mitigation in ruminants by dietary means: the role of their methane emission from manure. International Congress Series. In: C.R. Soliva, J. Takahashi and M. Kreuzer. Greenhouse gases and animal agriculture: An update. Elsevier. The Netherlands. International Congress Series. 1293: 199-208.
- Kristensen, T.; Mogensen, L.; Knudsen, M. y Hermansen, J.E. 2011. Effect of production system and farming strategy on greenhouse gas emissions from commercial dairy farms in a life cycle approach. *Livest. Sci.* 140: 136–148.
- Kwiatkowski, J.; McAloon, A.; Taylor, F. y Johnston B. 2006. Modeling the process and costs of fuel ethanol production by the corn dry-grind process. *Industrial Crops and Products.* 23: 288-296.
- Lassey, K. 2007. Livestock methane emission: From the individual grazing animal through national inventories to the global methane cycle. *Agric. Forest Meteorol.* 142: 120-132.
- Lassey, K. 2008. Livestock methane emission and its perspective in the global methane cycle. *Australian Journal of Experimental Agriculture.* 48: 114-118.
- Lattimer J.; Cooper S.; Freeman D. y Lalman D. 2007. Effect of yeast culture on in vitro fermentation of a high-concentrate or high-fiber diet using equine fecal inoculum in a DaisyII incubator. *J. Anim. Sci.* 85: 2484-2491.
- Leahy, S.; Kelly, W.; Ronimus, R.; Wedlock, N.; Altermann, E. y Attwood, G. 2013. Genome sequencing of rumen bacteria and archaea and its application to methane mitigation strategies. *Animal.* 7: 235-243.
- Lewis, S. y Dehority, V. 1985. Microbiology and ration digestibility in the hindgut of the ovine. *Appl. Environ. Microbiol.* 50: 402–412.
- Ley Nacional 24.295, Convención Marco de Naciones Unidas sobre Cambio Climático. Buenos Aires - 07/12/1993 - BOLETIN OFICIAL - 11/01/1994. <http://www2.medioambiente.gov.ar/mlegal/tratados/ley24295.htm> [Consultado 22/12/2011]
- Ley Nacional 25.438, Protocolo de Kyoto de la Convención Marco de las Naciones Unidas sobre el Cambio Climático. Kyoto - Japón. Sanc. 20/5/2001. Promulg. 13/6/2001. <http://www.ambiente.bioetica.org/normas/25438.htm> [Consultado 1/5/2012]

- Leyris, C.; Guillot, J.; Fanlo, L. y Pourtier, L. 2005. Comparison and development of dynamic flux chambers to determine odorous compound emission. rates from area sources. *Chemosphere* 59: 415-421.
- Loneragan, G.; Dargatz, D.; Morley, P. y Smith, M. 2001. Trends in mortality ratios among cattle in US feedlots. *Journal of the American Vet. Medical Assoc.* 219: 1122-1132.
- Lopez, M.; Ródenas, O.; Piquer, A.; Cerisuelo, C.; Cervera y Fernández, C. 2011. Determinación de producción de metano en caprinos alimentados con dietas con distintos cereales. *Arch. Zootec.* 60:943-951.
- López, M. 2008. Valoración nutricional de los rastrojos de piña (*Ananas comosus*) como alternativa forrajera de bajo costo para la alimentación del ganado. Tesis de licenciatura, Universidad de Costa Rica, Costa Rica.
- Lovett, D.; Bortolozzo, A.; Conaghan, P.; O’Kiely, P. y O’Mara, F. 2004. *In vitro* total and methane gas production as influenced by rate of nitrogen application, season of harvest and perennial rye grass cultivar. *Grass Forage Sci.* 59: 227–232.
- Mabjeesh, S.; Cohen, M. y Arieli, A. 2000. *In vitro* Methods for Measuring the Dry Matter Digestibility of Ruminant Feedstuffs: Comparison of Methods and Inoculum Source. *J. Dairy Sci.*, 83: 2289–2294.
- Machmüller, A.; Tavendale, M.; Lee, J.; Clark, H. y Meagher, L. 2007. Review of inhibitors of methane production. Chapter 2 in *Rumen Ecology, Pastoral Greenhouse Gas Research Consortium 2002–2007 Review*. New Zealand. http://www.pggrc.co.nz/Portals/0/annual%20reports/PGgRc_5yearfull%20chapter%202.pdf [Consultado 20/6/2013]
- MacIntyre, S.; Wanninkhof, R. y Chanton, J. 1995. Trace gas exchange across the air–water interface in freshwater and coastal marine environments. 52-97.
- Manazza F. e Iglesias D. 2008. Caracterización de la cadena Agroalimentaria de la carne vacuna de la provincia de San Luis. Documento de trabajo- Informe Anual 2008: INTA, EEA San Luis, Villa Mercedes, S L, Argentina.
- Mann, O. y Ørskov, E. 1973. The effect of rumen and post-rumen feeding of carbohydrates on the caecal microflora of sheep. *J. Appl. Bact.* 36: 475–484.
- Mercadante, E. 2015. Instituto de Zootecnia (IZ) de la Agencia Paulista de Tecnología de Agronecocio (APTA) perteneciente a la Secretaria de Agricultura y abastecimiento del Estado de São Paulo (Comunicación personal).

- Marten, G. y Barnes, R. 1980. Prediction of energy digestibility of forages with in vitro rumen fermentation and fungal enzyme systems. *Standardization of Analytical Methodology for Feeds*. International Research Center, Ottawa, Ontario, Canada, 61–71.
- Martin, C.; Morgavi, D. y Doreau, M. 2010. Methane mitigation in ruminants: from microbe to the farm scale. *Animal* 4: 351–365.
- Mauricio, R.; Owen, E.; Mould, F.; Givens, I.; Theodorou, M.; France, J.; Davies, D. y Dhanoa, M. 2001. Comparison of bovine rumen liquor and bovine faeces as inoculum for an in vitro gas production technique for evaluating forages. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 89: 33-48.
- McCaughey, W.; Wittenberg, K. y Corrigan, D. 1999. Impact of pasture type on methane production by lactating beef cows. *Can. J. Anim. Sci.*, 79: 221-226.
- McGeough, E.; O’Kiely, P.; Hart, K.; Moloney, A.; Boland, T. y Kenny, D.A. 2010. Methane emissions, feed intake, performance, digestibility, and rumen fermentation of finishing beef cattle offered whole-crop wheat silages differing in grain content. *J. Anim. Sci.* 88: 2703–2716.
- McGinn, S.; Beauchemin, K.; Coates, T. y Colombatto, D. 2004. Methane emissions from beef cattle: Effects of monensin, sunflower oil, enzymes, yeast, and fumaric acid. *Journal of Anim. Sci.* 82: 3346-3356.
- McGinn, S.; Beauchemin, K.; Iwaasa, A. y McAllister, T. 2006. Assessment of the Sulfur Hexafluoride (SF₆) Tracer Technique for Measuring Enteric Methane Emissions from Cattle. *Journal of Environmental Quality*. 35: 1686-1691.
- McGinn, S.; Chung, Y.; Beauchemin, K.; Iwaasa, A. y Grainger, C. 2009. Use of corn distillers’ dried grains to reduce enteric methane loss from beef cattle. *Can. J. Anim. Sci.* 89: 409–413
- Mendel, V. y Boda. 1961. *Journal of Dairy Sci.* 44: 1881-1898.
- Menke, K. y Ehrensverd, U. 1974. Effect of soluble carbohydrates on fermentation products in heat loss during in vitro incubation of . *Assoc. Anim. Prod.* 14: 91-94
- Miguelo, P.; Guzmán, L. y Sager, R. 2010. Análisis de variabilidad en la excreción de almidón entre bovinos de distintas razas y edades. *Rev. Arg. Prod. Anim.* Vol 31 Sup 1: 510.

- Miller, R.; Kuhn, M.; Norman, H. y Wright, J. 2008. Death losses for lactation cows in herds enrolled in Dairy Herd Improvement test plans. *J. Dairy Sci.* 91: 3710–3715.
- Mills, J.; Kebreab, C.; Yates, L.; Crompton, S.; Cammell, M.; Dhanoa, R.; Agnew, E. y France, J. 2003. Alternative approaches to predicting methane emissions from dairy cows. *J. Anim. Sci.* 81: 3141-3150.
- Mills, J.; Dijkstra, J.; Bannink, A.; Cammell, S.; Kebreab, E. y France, J. 2001. A mechanistic model of whole-tract digestion and methanogenesis in the lactating dairy cow: Model development, evaluation and application. *Journal of Animal Science* 79: 1584-1597.
- Moe, P. y Tyrrell, H. 1979. Methane production in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 62: 583-1586.
- Mohamed, R. y Chaudhry, A. 2008. Methods to study degradation of ruminant feeds. *Nutrition Research Reviews.* 21: 68-81.
- Montenegro, J. y Abarca, S. 2000. Fijación de carbono, emisión demetano y de óxido nitroso en sistemas de producción bovina en Costa Rica. *Intensificación de la ganadería en Centroamérica: beneficios económicos y ambientales.* 334.
- Morgavi, D.; Martin, C.; Jouany, J. y Ranilla, M. 2013. Rumen protozoa and methanogenesis: not a simple cause–effect relationship. *British Journal of Nutrition* 107: 388–397.
- Morgavi, D.; Forano, E. y Martin, C. 2010. Newbold Microbial ecosystem and methanogenesis in Ruminants *Animal.* 4: 1024-1036.
- Moss, A. y Givens, D. 2002. The effect of supplementing grass silage with soya bean meal on digestibility, *in sacco* degradability, rumen fermentation and methane production in sheep. *Animal Feed Science and Technology.* 97: 127-143
- Moss, A.; Jouany, J. y Newbold, J. 2000. Methane production by ruminants: its contribution to global warming. *Ann. Zootech.* 49: 231-253.
- Moss, A.; Givens, L. y Garnsworthy, P. 1995. The effect of supplementing grass silage with barley on digestibility, *in sacco* degradability, rumen fermentation and methane production in sheep at two levels of intake. *Anim. Feed Sci. Technol.* 55: 9-3.
- Muck, R y Richards. 1980. Losses of manurial N in freestall barns. *Agric. Manure* 7: 65–93

- Muñoz, T.; Yan, D.; Wills, S.; Murray, A. y Gordon. 2012. Comparison of the sulfur hexafluoride tracer and respiration chamber techniques for estimating methane emissions and correction for rectum methane output from dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 95: 3139-3148.
- Murray, J.; Longland, A. y Dunnett, C. 2008. Effect of yeast supplementation on the in vitro fermentation of high-temperature dried lucerne incubated with an equine faecal inoculum. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 146: 149–159.
- Nagaraja, T. y Titgemeyer, E. 2007. Acidosis in beef cattle. *J Dairy Sci.*90: 17-38
- Navarro-Villa, A.; O'Brien, M.; Lopez, S.; Boland, T. y O'Kiely, P. 2011. Modifications of a gas production technique for assessing in vitro rumen methane production from feedstuffs. *Anim. Feed Sci. Technol.* 166: 163–174.
- Nelson, N.; Steensma, K.; Utsumi, S.; Beede, D.; Zimmerman, S. y Zimmerman, P. 2012. Enteric methane emissions by dairy cows grazing temperate pastures. *J. Dairy Sci.* 95: 584.
- Newbold, C. y Rode. L. 2006. Dietary additives to control methanogenesis in the rumen. *Inter. Cong. Ser.* 1293: 138–147.
- Newbold, J. y Rust, S. 1992. Effect of asynchronous nitrogen and energy on growth of ruminal bacteria in batch culture. *J. Anim. Sci.* 70:538-546
- Nicholson, F.; Chambers, J.; Williams, R. y Unwin, J.2013. Heavy Metal Contents of Livestock Feeds and Animal Manures in England and Wales; *Blares. Technol.* 70: 23-31.
- Nkrumah, J.; Li, C.; Basarab, J.; Guercio, S.; Meng, Y.; Murdoch, B.; Hansen, C. y Moore, S. 2004. Association of a single nucleotide polymorphism in the bovine leptin gene with feed intake, feed efficiency, growth, feeding behaviour and carcass quality and body composition. *Can. J. Anim. Sci.* 84: 211–219
- Noguera, R.; Ramírez, I. y Bolivar, D. 2006. Efecto de la inclusión de papa (*Solanum tuberosum*) en la cinética de fermentación in vitro del pasto kikuyo (*Pennisetum clandestinum*). *Livestock Res Rural Develop.* 18:65.
- NRC, (National Research Council). 2001. Nutrient Requirement of Dairy Cattle. National Academy Press, Washington DC, USA. 131-132.
- NRC, (National Research Council). 2005. Mineral Tolerance of Animals: Second Revised Edition. Natl. Acad. Press. Washington, D.C. USA.

- O'Mara, F. 2011. The significance of livestock as a contributor to global greenhouse gas emissions today and in the near future. *Anim. FeedSci. Technol.* 7: 166-167.
- O'Neill, D. y Phillips, V. 1992. A review of the control of odour nuisance from livestock buildings: Part 3. Properties of the odorous substances which have been identified in livestock wastes or in the air around them. *J. Agric. Eng.* 53:23-50.
- OADDL. Oklahoma Animal Disease Diagnostic Laboratory. 2000. <http://www.cvhs.okstate.edu/oaddl> [Consultado 10/06/2015]
- Olkowski, A. 1997. Neurotoxicity and secondary metabolic problems associated with low to moderate levels of exposure to excess dietary sulphur in ruminants: a review. *Vet. Human Toxicology.* 39:355-360.
- Omed, H.; Lovett, D. y Axford, R. 2000. Faeces as a source of microbial enzymes for estimating digestibility. *Forage Evaluation in Ruminant Nutrition.* CAB International, Wallingford. 135-154.
- Ørskov, E. y McDonald, I. 1979. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage *Journal of Agricultural Science Cambridge.* 92: 499-503
- Ørskov, E.; Mayes, R. y Mann, S. 1972. Post-ruminal digestion of sucrose in sheep. *Br. J. Nutr.* 28: 425-432.
- Ørskov, E.; Fraser, C.; Mason, V. y Mann, S. 1970. Influence of starch digestion in the large intestine of sheep on caecal fermentation, caecal microflora and faecal nitrogen excretion. *Br. J. Nutr.* 24: 671-682.
- Osborne, V.; Radhakrishnan, S.; Odongo, N.; Hill, A. y McBride, B. 2008. Effects of supplementing fish oil in the drinking water of dairy cows on production performance and milk fatty acid composition. *J Anim Sci* 86: 720-729.
- Palladino, R.; Jaurena, G.; Wawrzewicz, M.; Danelon, J. Gallardo, M. y Gaggiotti, M. 2005. Producción de gas *in vitro* de alfalfa fresca (*Medicago sativa* L.) bajo distintas condiciones de acidez ruminal utilizando donantes alimentadas con suplementos conteniendo Monensina. 28° Congreso Argentino de Producción Animal. Bahía Blanca. Argentina.
- Palmquist, D. y Jenkins, T. 1980. Fat in lactation rations: Review. *J. Dairy Sci.* 63: 1-14.
- Payne, J.M. 1977. *Metabolic diseases in farm animals*, Heidemann Medical Books, London, England.

- Pell, A. y Schofield, P. 1993. Computerized monitoring of gas production to measure forage digestion in vitro. *J. Dairy Sci.* 76:1063
- Pell, A.; Pitt, R.; Doane, P. y Schofield, P. 1998. The development, use and application of the gas production technique at Cornell University, USA. in: Deaville, E; Owen, E.; Adesogen, A.; Rymer, C.; Huntington, J. y Lawrence, J. Eds. *In Vitro Techniques for Measuring Nutrient Supply to Ruminants*. BSAS, Edinburgh, UK. 22: 45-54.
- Pelletier, N., Pirog, R. y Rasmussen, R. 2010. Comparative life cycle environmental impacts of three beef production strategies in the Upper Midwestern United States. *Agric. Syst.* 103: 380–389.
- Pinares-Patiño, C.; Baumont, R. y Martin, C. 2003. Methane emissions by Charolais cows grazing a monospecific pasture of timothy at four stages of maturity. *Can. J. Anim. Sci.* 83: 769–777.
- Power, V.; Maguire, D.; Cantrell, B; Stafford, T; Roone, B. y Lynott, D. 2001. Odour impacts and odour emission control measures for intensive agriculture. Final report. Environmental Protection Agency. 141-145.
- Pretty J. N. 2008. Resource-Conserving Agriculture Increases Yields in Developing Countries. *Environmental Science and Technology* 40: 1114-1119
- Pritchard, R. y Bruns, K. 2003. Controlling variation in feed intake through bunk management. *J. Anim. Sci.* 81: 133-138.
- Protocolo de Kyoto de la Convención Marco de las Naciones Unidas sobre el Cambio Climático. 1998.
<http://unfccc.int/resource/docs/convkp/kpspan.pdf> [Consultado 1/4/2013]
- R Programa estadístico <https://www.r-project.org/> [Consultado 1/11/2013]
- Ramanzin, M.; Bailoni, L. y Schiavon S. 1997. Effect of forage to concentrate ratio on comparative digestion in sheep, goats and fallon deer. *Anim. Sci.*, 64: 163-170.
- Relling, A. y Mattioli, G. 2003. *Fisiología Digestiva y Metabólica de los Rumiantes*. Facultad Ciencias Veterinarias. Argentina. Universidad Nacional de La Plata.
- Reynolds, C.; Cammell, S.; Humphries, D.; Beaver, D.; Sutton, J. y Newbold, J. 2001. Effects of post rumen starch infusion on milk production and energy metabolism in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 84: 2250–2259.
- RIAN-SENASA. 2009. Stock 2009 del Ganado Bovino de Carne. Mapas de Existencias e Indicadores. INTA, EEA San Luis. Argentina. 174.

- Rienzo, J.; Casanoves, F.; Balzarini, M.; Gonzalez, L.; Tablada, M. y Robledo C. InfoStat versión 2015. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba. <http://www.infostat.com.ar> [Consultado 20/8/2011]
- Robinson, P.; Tamminga, S. y van Vuuren, A. 1986. Influence of declining level of feed intake and varying the proportion of starch in the concentrate on rumen fermentation in dairy cows. *Livest. Prod. Sci.* 15: 173-184.
- Sager R.; Hamar D. y Gould D. 1990. Clinical and biochemical alterations in calves with nutritionally induced polioencephalomalacia. *Am. J. Vet. Res.* 51:1969-1974.
- Santini, F. y Dini, C. 1986. Estimación de la proteína metabolizable de varios suplementos y henos. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 6:13-22.
- Sauvant, D.; Meschy, F. y Merte, J. 1999. *Dairy Sci.* 76: 826
- SAYDS, (Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable). 2007. 2a Comunicación Nacional de la República Argentina a la Convención Marco de las Naciones Unidas sobre Cambio Climático. 201. <http://www.ambiente.gov.ar/?idarticulo=1124> [consultado 14/5/2014]
- Schils, R.; Olesen, J.; Del Prado, A. y Soussana, J. 2007. A review of farm level modelling approaches for mitigating greenhouse gas emissions from ruminant livestock systems. *Livestock Science.* 112: 240-251.
- Schneider, B. y Flatt, P. 1975. *The Evaluation of Feeds Through Digestibility Experiments.* The University of Georgia Press, Athens.
- Schofield, P; Pitt, R. y Pell, A. 1994 Kinetics of fiber digestion from *in vitro* gas production. *Journal of Animal Science.* 72: 2980-2991.
- Schoonmaker, J. y Beitz, D. 2012. Hydrogen sulphide: synthesis, physiology, roles and pathology associated with feeding cattle maize co-products of the ethanol industry. En, Harinder P.S. Makkar, ed., *Biofuel co-products as livestock feed: Opportunities and challenges.* 101-113.
- Shultz, T. y Collar C. 1993. *Dairying and air emissions.* Univ. of California Cooperative Extension. Dairy manure management series.
- Sierra, A. y Morante, Z. 2007. Experimentación en química analítica. <http://books.google.com.mx/books?id=YdtzV12beGMC&pg=PA129&dq=aci> [cónsul. 2010]
- Singh, S.; Kushwaha, B.; Nag, S.; Mishra, A.; Bhattacharya, S.; Gupta, P. y Singh, A. 2011. *In vitro* methane emission from Indian dry roughages in relation to chemical composition. *Curr. Sci. India* 101: 57-65.

- Smith, P.; Martino, D.; Cai, Z.; Gwary, D.; Janzen H. y Kumar, P. 2007. Mitigation Contribution of Working Group III to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge: Cambridge University. 320.
- Smith, K.; Clayton, H.; McTaggart, I.; Thomson, P.; Arah, J. y Scott, A. 1995. The Measurement of Nitrous-Oxide Emissions from Soil by Using Chambers. Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series A-Mathematical Physical and Engineering Sciences. 351: 327-337.
- Sommer, S.G., Olesen, J.E., Petersen, S.O., Weisbjerg, M.R., Valli, L., Rodhe, L. y Béline, F. 2010. Region-specific assessment of greenhouse gas mitigation with different manure management strategies in four agroecological zones. Global Change Biol. 25: 2825–2837.
- Sommer, S.; Møller, H. y Petersen, S. 2001. Reduktion af drivhus gas emission fra gylle og organisk affald ved biogás behandling. Danish Institute of Agricultural Sciences 31. Dinamarca: Husdyrbrug.
- Srinivasan, M.; Bryant, R.; Callahan, M.; y Weld, J. 2006. Manure management and nutrient loss under winter conditions: A literature review. J. Soil Water Conserv. 61: 200–209.
- Stanford, K; McAllister, T. y Ayroud, M. 2006. Effect of dietary melengestrol acetate on the incidence of acute interstitial pneumonia in feedlot heifers. Can J Vet Res. 70: 218-225.
- Steinfeld, H.; Gerber, T.; Wassenaar, V.; Castel, M.; Rosales y Haan, C. 2006. Livestock's Long Shadow. Food and Agriculture Organization of the United Nations.
<http://www.fao.org/docrep/010/a0701e/a0701e00.htm>[Consultado 7/10/2011]
- Stewart, A. Little, S. Ominski, K, Wittenberg, K. y Janzen, H. 2009. Evaluating greenhouse gas mitigation practices in livestock systems: illustration of a whole-farm approach. Journal of Agricultural Science, 147: 367-382
- Stock, R.; Brink, D. y Brandt, R. 1995. Feeding combinations of high moisture corn and dry corn to finishing cattle. J Anim Sci. 65:282

- Strobel, H. y Russell, J. 1986. Effect the pH and energy spelling on bacterial protein synthesis by carbohydrate-limited cultures of mixed rumen bacteria. *J. Dairy Sci.* 69: 2941-2947.
- Sutton, J; Dhanoa, M.; Morant, S.; France, J.; Napper, D. y Schuller, E. 2003. Rates of production of acetate, propionate, and butyrate in the rumen of lactating dairy cows given normal and low-roughage diets. *J. Dairy Sci.* 86: 3620-3633.
- Tarawali, S.; Herrero, M.; Descheemaeker, K.; Grings, E. y Blümmel, M. 2011. Pathways for sustainable development of mixed crop livestock systems: Taking a livestock and pro-poor approach. *Livest. Sci.* 139: 11–21.
- Teuber, M. 2001. Veterinary use an antibiotic resistance. *Current Opinion in Microbiology* 4: 493-499.
- Theodorou, M.; Williams, B.; Dhanoa, M.; McAllan, A. y France, J. 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Anim. Feed Sci. Technol.* 48: 185–197.
- Thomassen, M.; vanCalker, K.; Smits, M.; Lepema, G. y Boer, J. 2008. Life cycle assessment of conventional and organic milk production in the Netherlands. *Agric. Systems* 96: 95-107.
- Tilley, J. y Terry, R. 1963. A two stage technique for the in vitro digestion of forage crops. *J. Br. Grassl. Soc.* 18-104.
- Tovar, T. 2002. El Efecto Invernadero y el Dióxido de Carbono. <https://www.todo.ciencia.com>[Consultado 2/3/2015]
- Ushida, K. 2010. Symbiotic methanogens and rumen ciliates. En J.H.P. Hackstein, ed. *Endo.* 25-34.
- Uwituze, S.; Parsons, G.; Karges, K.; Gibson, M.; Hollis, L.; Higgins, J. y Drouillard, J. 2011b. Effects of distillers grains with high sulfur concentration on ruminal fermentation and digestibility of finishing diets. *J Anim Sci*, 89: 2817-2828.
- Valles, J. 2010. Acute interstitial pneumonia in feedlot cattle. Department of Clinical Sciences College of Veterinary Medicine. Kansas State University. 35.
- van der Mensbrugge; D.; Osorio-Rodarte, I.; Andrew Burns y John Baffes. 2010. Macroeconomic Environment and Commodity Markets. In Piero Conforti. Ed. *Looking Ahead in World Food and Agriculture.* Roma.
- van Kessel, J. y Russell, J. 1995. The Effect of Amino Nitrogen on the Energetics of Ruminant Bacteria and its Impact on Energy Spilling. *J. Dairy Sci.* 79:1237-1243.

- van Soest, P.J. 1994. Nutritional ecology of the ruminant. 2^a Ed. Cornell University Press. Comstock. 476.
- van Zijderveld, S.; Dijkstra, J.; Gerrits, W.; Newbold, J. y Perdok, H. 2011. Persistency of methane mitigation by dietary nitrate supplementation in dairy cows. *J Dairy Sci.* 94: 4028-4038.
- VanderZaag, A.; Jayasundara, S. y Wagner-Riddle, C. 2011. Strategies to mitigate nitrous oxide emissions from land applied manure. *Anim. Feed Sci. Technol.* 166–167: 464–479
- Váradyová, Z.; Baran, M. y Zelenák I., 2005. Comparison of two in vitro fermentation gas production methods using both rumen fluid and faecal inoculum from sheep. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 123-124, 81–94.
- Varel H; Nienaber A. y Freetly C. 1999. Conservation of nitrogen in cattle feedlot waste with urease inhibitors. *Journal of Animal Science*, 77: 1162–1168
- Velthof, G. y Mosquera, J. 2011. The impact of slurry application technique on nitrous oxide emission from agricultural soils. *Agric. Ecosyst. Environ.* 140: 298–308.
- Waghorn, G. y Hegarty, R. 2011. Lowering ruminant methane emissions through improved feed conversion efficiency. *Anim. Feed Sci. Technol.* 166: 291–301.
- Wang, S. y Huang, D. 2005. Assessment of greenhouse gas emissions from poultry enteric fermentation. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences.* 18: 873-878.
- Watson, C. y Atkinson, D. 1999 Using nitrogen budgets to indicate nitrogen use efficiency and losses from whole farm systems: a comparison of three methodological approaches. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 53: 259-267.
- Watson, R.; Zinyowera, C. y Moss, R. 1996. Agriculture sector in Technologies, Policies and Measures for Mitigating Climate Change. IPCC. 49–53
- Wattiaux, M. 2000. El Metabolismo de los Carbohidratos en las vacas lecheras. *Revista el Agropecuario. Ecuador.* 474: 22-24.
- Weiske, A.; Vabitsch, A.; Olesen, J.; Schelde, K.; Michel, J.; Friedrich, R. y Kaltschmitt, M., 2006. Mitigation of greenhouse gas emissions in European conventional and organic dairy farming. *Agric. Ecosyst. Environ.* 112: 221-232.
- Weiss, W. y Pinos-Rodriguez, J. 2009. Production responses of dairy cows when fed supplemental fat in low- and high-forage diets. *J. Dairy Sci.* 92: 6144–6155.

- White, T.; Snow, V. y King, W. 2010. Intensification of New Zealand beef farming systems. *Agricultural Systems* 103: 21–35.
- William, H.; Kruskal y Allen, W. 1952. Use of ranks in one-criterion variance analysis. *Journal of the American Statistical Association* 47: 583-621.
- Williams, A.; Audsley, E. y Sandars, D. 2006. Determining the environmental burdens and resource use in the production of agricultural and horticultural commodities. Main Report. Defra Research Project IS0205. www.silsoe.cranfield.ac.uk, and www.defra.gov.uk , [Consultado 12/5/2015]
- Williams, A. y Coleman, S. 1992. *The rumen protozoa*. Springer-Verlag New York Inc., New York.
- Williams, S.; Fisher, P.; Berrisford, T.; Moate, P. y Reynard, K. 2014. Reducing methane on farm by feeding diets high in fat may not always reduce life cycle greenhouse gas emissions. *The International J. of Life Cycle Assessment*. 19, 69-78.
- Willms, W.; Kenzie, O.; McAllister, T.; Colwell, D.; Veira, D.; Wilmshurst, J.; Entz, T. y Olson M. 2002. Effect of water quality on cattle performance. *Journal of Range Management*. 55: 452-460.
- Winichayakul, S.; Cookson, R.; Scott, R.; Zhou, J.; Zou, X.; Roldan, M.; Richardson, K. y Roberts, N. 2008. Delivery of grasses with high levels of unsaturated, protected fatty acids. *Proc. NZ Grass Assoc.* 70: 211–216.
- Wolin, M.; Miller, T. y Stewart, C. 1997. Microbe-microbe interactions. *The Rumen Microbial Ecosystem*. 467–491.
- Yan, T.; Frost, J.; Agnew, R.; Binnie, R. y Mayne, C. 2006. Relationships between manure nitrogen output and dietary and animal factors in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 89: 3981–3991.
- Yang, W.; Martens, H. y Shen. 2009. Effects of energy intake and ruminal SCFA on mRNA expression of Na⁺/H⁺ exchangers in rumen epithelium of goats. *Proc. 11th Int. Symp. of Rumin. Physiol.* 412-413.
- Yang, W. y Beauchemin, K. 2009. Increasing physically effective fibre content of dairy cow diets through forage proportion versus forage chop length: Chewing and ruminal pH. *J. Dairy Sci.* 92: 1603–1615
- Yocom, J. y McCarthy, S. 1991. *Measuring Indoor Air Quality. A Practical Guide* John Wiley y Sons, Inc. Chichester, England.

- Zahn, J.; Hatfield, Y.; Do, A.; DiSpirito, D.; Laird, D. y Pfeiffer, R. 1997. Characterization of volatile organic emissions and wastes from a swine production facility. *J. Environ. Qual.* 26: 1687-1696.
- Zehetmeier, M.; Hoffmann, H.; Sauer, J.; Hofmann, G.; Dorfner, G. y O'Brien, D. 2014. A dominance analysis of greenhouse gas emissions, beef output and land use of German Dairy Farms, *Agricultural Systems*. 129: 55-67.
- Zhan, A.; Di Spirito, A.; Do, Y.; Brooks, B.; Cooper, E. y Hatfield, J. 2001. Correlation of human olfactory responses to airborne concentrations of malodorous volatile organic compounds emitted from swine effluent. *J. Environ. Qual.* 30: 624-634.
- Zinn, R.; Álvarez, M.; Méndez, M.; Montaña, E; Ramírez y Shen. 1997. Influence of dietary sulfur level on growth performance and digestive function in feedlot cattle. *J Anim Sci* 75: 1723-1728.

