

# **Doctorado en Ciencia Animal**

## **Tesis**

**Eficiencia en el uso del nitrógeno en vacas lecheras y  
su impacto en el ambiente**

**Por: María Paz Tieri**

**Facultad de Ciencias Veterinarias**

**U.N.C.P.B.A**



**2020**

# **Doctorado en Ciencia Animal**

## **Tesis**

### **Eficiencia en el uso del nitrógeno en vacas lecheras y su impacto en el ambiente**

**Por: María Paz Tieri**

**Director: Ing.Agr. Dr. Horacio Leandro Gonda**

**Co-director: Ing.Agr. Dr. Eduardo Alberto Comerón**

**Facultad de Ciencias Veterinarias**

**U.N.C.P.B.A**

**Miembros del Jurado:**

**Prof. Dr. Claudio Machado**

**Prof. Dr. José I. Arroquy**

**Prof. Dr. Ronaldo Vibart**

## **DEDICATORIA**

**A Mario, a Maite y a nuestra familia.** por su apoyo incondicional a lo largo del doctorado, por estar siempre a mi lado y ayudarme en todo momento a lo largo de estos años, y por su paciencia y comprensión durante los momentos más difíciles.

## AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que de alguna manera han hecho posible la realización de este trabajo. Y muy especialmente:

A mi director el Dr. Horacio Gonda. Gracias Picho, por la dirección de este trabajo, por tu paciencia, tus consejos, y, sobre todo, por tu hospitalidad y la de tu familia.

A mi codirector de tesis y director de beca de posgrado, el Dr. Eduardo Comerón. Gracias Eduardo por tu pasión, tu inmensa sabiduría y apoyo durante los años compartidos.

Al Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) que posibilitó la realización del doctorado a través de la beca de posgrado y del apoyo de los proyectos de investigación y a las autoridades de INTA Rafaela y del Área de Producción Animal por apoyarme y darme tiempo para finalizar esta tesis.

A Mónica Gaggiotti y Natalia Elfenbein del laboratorio de Forrajes por su apoyo a lo largo de los diferentes ensayos realizados y a Alejandra Cuatrín por su contribución al análisis de datos de los ensayos realizados, que siempre ha sido generosa con su conocimiento, y predispuesta a las consultas y a encontrar soluciones.

A la Dra. Patricia Engler y el proyecto de Lechería por colaborar en el acceso a los datos de las encuestas para la construcción del diagnóstico de los sistemas lecheros nacionales.

A mis compañeros y autoridades de la Facultad Regional Rafaela, Universidad Tecnológica Nacional por su apoyo y comprensión durante el desarrollo de esta tesis.

Al Prof. Sergio Guzmán, la Dra. Paula Juliarena y su equipo, responsables del desarrollo y soporte de las mediciones de metano entérico, por su asesoramiento y trabajo para que las mediciones sean posibles. A la Dra. Laura Nadin y la Dra. María Eugenia Priano, compañeras de pasantía Facultad de Agronomía de la Universidad de Rio Grande do Sul y amistades de Tandil.

Al Dr. Paulo Carvalho y a la gente de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Rio Grande do Sul por su calidez humana, porque me abrieron las puertas y me dieron la posibilidad de aprender en el marco de la pasantía realizada en el marco del posgrado para el aprendizaje de la metodología para medir emisiones de gases de efecto invernadero.

A la Dra. Delfina Montiel, Gustavo Depetris, Francisco Stefañuk y sus compañeros del laboratorio de nutrición animal por introducirme en la ciencia de los fermentadores, darme los consejos necesarios y la posibilidad de integrarme a su equipo. Al Dr. José Gere, la Dra. María Ceron Cucchi, y a sus compañeros del Instituto de Patobiología del INTA Castelar, quienes abrieron las puertas de su grupo y del laboratorio para enseñarme y poder llevar a cabo diferentes

análisis que fueron parte de la tesis.

A los Ing. Agr. Jordan Giacosa, Leonardo Brizio y Noelí De Marco con quienes transitamos juntos la realización del ensayo a campo y fueron fundamentales para la realización del mismo.

A mi amiga y vecina de oficina Lorena Iacopini y a mi compañera de trabajo Verónica Charlón, quienes estuvieron acompañándome a lo largo del doctorado, por estar ahí y saber escuchar.

A mi amiga y compañera de trabajo Dra. Claudia Faverin, con quien compartimos el mismo entusiasmo en los temas que trabajamos e hizo de guía durante el transcurso de la tesis y quien supo hospedarme en reiteradas ocasiones en su hogar, junto a su familia, Federico y Facundo.

El agradecimiento más especial va dirigido a toda mi familia. A Mario, por su apoyo incondicional a lo largo del doctorado, por estar siempre a mi lado y ayudarme en todo momento a lo largo de estos años, y por su paciencia y comprensión durante los momentos más difíciles.

A nuestra pequeña Maite, quien llegó para el final del doctorado y fue mi fuente de inspiración para la finalización del mismo.

A mis padres, mi abuela y a mi hermano por todo lo que soy, por creer en mí y hacerme sentir alguien especial.

A todos ellos, infinitas gracias.

## RESUMEN

El productor agropecuario se enfrenta al desafío de mejorar la eficiencia de uso de los recursos disponibles y, al mismo tiempo, reducir la contaminación ambiental. La producción animal representa una fuente significativa de gases de efecto invernadero (GEI) a través de la emisión de metano ( $\text{CH}_4$ ) y óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ), además de la contaminación del agua con nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) y la volatilización de amoníaco ( $\text{NH}_3$ ). La optimización de la nutrición del ganado lechero es una herramienta clave para la problemática ambiental provocada por la acumulación de nitrógeno (N) y la emisión de  $\text{CH}_4$  en los sistemas lecheros. A pesar de la importancia que tiene en nuestro país la producción lechera, hasta el presente existe poca información sobre emisiones de  $\text{CH}_4$  y sobre la relación entre la eficiencia de utilización del N de la dieta (EUN) y las emisiones de  $\text{CH}_4$  en vacas lecheras. En este contexto, la presente tesis doctoral tiene como objetivo estudiar el efecto de distintos niveles de proteína bruta (PB) de la dieta sobre la productividad animal, la fermentación ruminal, el destino del N consumido y el impacto ambiental de vacas Holando Argentino en lactancia.

En el capítulo 2, como parte de la revisión bibliográfica del tema, se realizó la evaluación de la situación actual con respecto a los niveles de PB utilizados y recomendados a nivel nacional e internacional, y la EUN. Para ello, se estudió la variabilidad de los niveles de PB en las dietas utilizadas en vacas en ordeño a nivel nacional, la secreción de N en leche, su relación con la EUN de la dieta, y las emisiones de  $\text{CH}_4$  entérico en 122 sistemas lecheros de las principales cuencas lecheras del país. Los valores de PB en los sistemas de Argentina observados fueron altos con respecto a las recomendaciones internacionales. Las EUN observadas fueron menores a las deseadas, demostrando que aún quedan muchas estrategias para mejorar este indicador. A continuación, en el capítulo 3, se realizó una revisión sistemática y un análisis global de las relaciones entre las variables en los resultados de 53 ensayos de alimentación publicados que tuvieron como objetivo evaluar diferentes concentraciones de PB en la dieta de vacas lecheras. Se realizó un análisis de componentes principales para evaluar las relaciones de las variables bajo estudio, y posteriormente, a fin de determinar la función que relaciona la concentración de PB (%) y variables productivas, se realizó un análisis a través de regresiones aleatorias. La revisión sistemática permitió generar una síntesis de la evidencia disponible para proseguir con el análisis en profundidad de las relaciones entre las variables. Si bien en algunas variables, como el consumo de materia seca (CMS), el contenido de proteína en leche y el N ureico en leche (NUL) tuvieron

poca variabilidad de respuesta, la producción de leche individual y la EUN tuvieron una respuesta variable, siendo ambas variables de importancia para el costo de la dieta y el resultado económico final. La alta correlación negativa entre la concentración de NUL y la EUN demostró su utilidad como indicador de la eficiencia de utilización del N.

En el capítulo 4, con el objetivo de evaluar la EUN de la dieta, la emisión de CH<sub>4</sub> entérico, la producción de leche (PL) y el resultado económico, se llevó a cabo un ensayo a campo en vacas Holando Argentino en lactancia alimentadas con dietas con distinto contenido de PB; 13, 16 y 19 % PB. Con CMS y materia orgánica (MO) digestible similares, al aumentar el contenido de PB en la dieta) aumentó de forma lineal la PL (+ 16 %), el contenido y la excreción de proteína en leche (PBL). La excreción de N en leche (NL) mostró la misma tendencia que la PBL. Con respecto a la EUN, cuanto mayor fue el consumo de N (CN), menor fue la EUN. El volumen de orina, el N excretado en orina (NOr), y el N en forma de urea en orina (NUOr), al igual que la proporción de CN excretado en orina en forma de NOr y NUOr, aumentaron significativamente en respuesta al contenido de PB. La emisión diaria de CH<sub>4</sub> entérico, la intensidad de emisión y la tasa de conversión de CH<sub>4</sub> (Y<sub>m</sub>) no se vieron afectadas por el nivel de PB de la dieta. Con respecto a los indicadores económicos, el costo de la ración fue mayor a medida que aumentó el porcentaje de PB de la dieta. Sin embargo, al aumentar la PB de la dieta aumentó la PL, lo que permitió un mayor rendimiento de leche libre de ración, un mayor ingreso por vaca, y un mayor margen bruto. No obstante, los costos potenciales debido a una mayor excreción de N, y por lo tanto un mayor riesgo de lixiviación de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> y de emisión de N<sub>2</sub>O, fueron mayores a medida que se incrementó en contenido de PB. Estos resultados muestran que la optimización del contenido de PB en la dieta deberá ser un balance entre los impactos económicos y ambientales en la PL, ya que el consumo excesivo de N implicaría una mayor pérdida en forma de urea a través de la orina, lo que llevaría a un aumento de las emisiones de NH<sub>3</sub> y N<sub>2</sub>O.

Por último, en el capítulo 5, se llevó a cabo un ensayo en un sistema *in vitro* de doble flujo continuo con el objetivo de evaluar los efectos del aumento de los niveles de PB dieta utilizadas en ganado lechero sobre la fermentación ruminal, el metabolismo ruminal del N, la eficiencia de síntesis microbiana, la población microbiana y la producción de CH<sub>4</sub> y. El aumento de la PB en la dieta (13, 16 y 19 % PB) no tuvo un efecto significativo en la digestibilidad *in vitro* de la MS, la MO o de la fibra. A medida que el contenido de PB aumentó, el pH ruminal medio aumentó linealmente, al igual que el pH máximo y mínimo. Las concentraciones de ácidos grasos volátiles totales (AGVT) y proporciones molares de acetato (C2), butirato (C4) y valerato (C5) no se vieron

afectadas por los tratamientos, existiendo una tendencia a disminuir los AGVT de forma lineal a medida que aumenta el nivel de PB. Para el caso del propionato (C3), al igual que el iso-valerato y contrariamente al iso-butirato, si bien no hubo diferencias entre tratamientos, se observó una disminución en la proporción molar con el aumento en el contenido de PB de la dieta. La relación C2:C3 aumentó linealmente con el contenido de PB en la dieta. La emisión de CH<sub>4</sub>, y la densidad de la población de bacterias totales y metanogénicas no difirieron entre tratamientos. En lo que respecta al metabolismo del N, la concentración ruminal de N-NH<sub>3</sub> en el efluente (mg/dL), así como el flujo de N total y N-NH<sub>3</sub> (g/d), aumentaron linealmente al aumentar el contenido proteico de la dieta. Por el contrario, el flujo de N no amoniacal y de N bacteriano disminuyeron linealmente con el aumento de la PB de la dieta, siendo este último 32% menor en el tratamiento con mayor respecto al de menor contenido de PB. La digestibilidad de la proteína y la eficiencia de síntesis bacteriana (g N/kg MO), no se vieron afectadas por el contenido proteico en la dieta, observándose una tendencia a una disminución lineal a medida que el contenido de PB fue mayor. Dietas con niveles decrecientes de PB dieron como resultado patrones alterados de fermentación ruminal, como el pH ruminal y los cambios en el metabolismo de parte de los AGV y el N. Las dietas con 13% y 16% de PB proporcionaron efectos positivos sobre el flujo de N microbiano y una tendencia hacia una mejor eficiencia microbiana en el rumen; por lo tanto, fueron la mejor estrategia para una mejorar la utilización de N en el rumen. Más allá de ese nivel, no hubo más beneficios de alimentar una mayor PB en la dieta.

**Palabras claves:** ganadería, lechería, nitrógeno, eficiencia, excretas, ambiente, gases de efecto invernadero, metano.

## ABSTRACT

Farmers are facing new challenges, having to improve the efficiency of use of available resources, and at the same time adapt to the demands in order to reduce environmental pollution. Animal production represents a significant source of GHG through methane (CH<sub>4</sub>) and nitrous oxide (N<sub>2</sub>O) emission, in addition to nitrates (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) water pollution and ammonia (NH<sub>3</sub>) volatilization. The dairy cattle nutrition is a key tool for environmental problems caused by nitrogen (N) accumulation and CH<sub>4</sub> emission in dairy systems. Despite the importance of milk production in our country, there is little information on CH<sub>4</sub> emissions and its relationship with dietary N use efficiency (NUE) in dairy cows. In this context, the objective of this doctoral thesis was to study the effect of different dietary crude protein (CP) levels on productivity, ruminal fermentation, N intake fate and the environmental impact in Argentine Holstein dairy cows.

As part of the literature review, in chapter 2, an evaluation of the CP levels currently used and the NUE values in Argentinian dairy systems was carried out. The dietary CP levels variability used in dairy cows, milk N secretion, its relationship with the NUE and enteric CH<sub>4</sub> emissions of 122 national dairy systems located in main dairy basins of the country were studied. CP levels in Argentina's systems were high compared to international recommendations. Also, NUE values were lower than desired, demonstrating that there are still many strategies to improve this indicator. Furthermore, in chapter 3, a systematic review of 53 published feeding trials that evaluated different dietary CP in dairy cows, and global analysis of the relationships between under study variables, was carried out. For that purpose, a main components analysis of was done, and later, through random regressions, the function that relates the CP levels (%) and productive variables were determined. The systematic review allowed a synthesis of the available evidence to continue with the in-depth analysis of the relationships between variables. Although in some variables, such as dry matter intake (DMI), milk protein content and milk urea N (MUN) had low response variability, individual milk production and NUE had a variable response, being both variables of importance for the diet cost and the economic result. The high negative correlation between MUN concentration and NUE demonstrated MUN usefulness as a NUE indicator.

In order to evaluate dietary NUE, enteric CH<sub>4</sub> emission, milk production and economic results on Argentine Holstein dairy cows fed diets with different CP levels (13, 16 and 19 %) in chapter 4, a field trial was carried out. With similar DMI and organic matter (OM) digestibility, an increase in dietary CP content allowed a linear increase of milk production (+ 16 %), milk

protein content and yield. Milk N excretion (MN) showed the same trend as milk protein yield. In addition, a higher N intake (NI) generated lower EUN. Urine volume, N excreted in urine (NU), and urea N in urine (UNU), as well as the proportion of NI excreted in urine, increased significantly in response to dietary CP level. Daily enteric CH<sub>4</sub> emission, emission intensity and CH<sub>4</sub> conversion rate ( $Y_m$ ) were not affected by dietary CP content. Respect to the economic indicators, the ration cost was higher as the percentage of dietary CP increased. However, as CP level increased, the milk production increased and allowed a higher milk yield free of ration cost, a higher income per cow, and a higher gross income. However, the potential costs due to increased excretion of N to the environment, and therefore increased risk of NO<sub>3</sub><sup>-</sup> leaching and N<sub>2</sub>O emission, were higher as dietary CP content increased. These results show that optimizing CP content should be a balance between economic and environmental impacts on milk production, since excessive N intake would imply greater loss in the form of urea through the urine.

Finally, a dual-flow continuous culture fermenter system was used to assess the effect of increased dietary CP levels used in dairy cattle on ruminal fermentation, N metabolism, microbial synthesis efficiency, microbial population and CH<sub>4</sub> production (chapter 5). The increase of dietary CP content (13, 16 and 19 % PB) didn't have a significant effect on the *in vitro* DM, OM of fiber digestibility. As dietary CP content increased, the mean, maximum and minimum ruminal pH increased linearly. The total volatile fatty acids (TVFA) concentration and molar proportions of acetate (C2), butyrate (C4) and valerate (C5) were not affected by treatments, with a tendency to decrease linearly the concentration of TVFA as dietary CP level increases. In the case of propionate (C3) and iso-valerate, although there were no differences between treatments, there was a decrease in the molar ratio with an increase in dietary CP content. The relationship C2:C3 increased linearly as the CP concentration was higher. CH<sub>4</sub> production, total bacteria and methanogenic bacteria population density were similar between treatments. Respect to N metabolism, ruminal NH<sub>3</sub>-N effluent concentration (mg/dL), as well as total N (TN) and NH<sub>3</sub>-N (g/d) flow, increased linearly as CP content increased. In contrast, non NH<sub>3</sub>-N flow (NAN) and bacterial N decreased linearly with increasing content of CP, being 32% lower in high CP diet respect to the lower CP content diet. The protein digestibility and bacterial synthesis efficiency (g N/kg OM) were not affected by treatments, with a tendency of a linear decrease as dietary CP content increased. Diets with decreasing dietary CP levels resulted in altered patterns of ruminal fermentation, such as ruminal pH and changes in VFA and N

metabolism. Diets with 13 and 16 CP % had positive effects on bacterial N flow and a tendency for improved efficiency of bacterial N synthesis. Therefore, both treatments were the best strategy for improving ruminal NUE. Beyond 16 CP %, there was no further benefit of feeding a higher dietary CP level.

**Keywords:** livestock, dairy, nitrogen, efficiency, excreta, environment, greenhouse gases, methane.

## **ABREVIATURAS**

AA: aminoácidos

ACV: Análisis de Ciclo de Vida

AGV: ácidos grasos volátiles

CH<sub>4</sub>: metano

CHOs: carbohidratos

CMS: consumo de materia seca

CO<sub>2</sub>: dióxido de carbono

COV: compuestos orgánicos volátiles

DP: derivados de purinas

E: energía

EB: energía bruta

EE: extracto etéreo

EEA: Estación Experimental Agropecuaria

EfE: eficiencia energética

EM: energía metabolizable

EUN: eficiencia en el uso del nitrógeno

FAO: Organización de Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura

FDA: fibra detergente ácido

FDN: fibra detergente neutro

FE: factor de emisión

GB: grasa butirosa

GEI: Gases de efecto invernadero

IE: intensidad de emisión

INTA: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria

IPCC: Panel Intergubernamental para el Cambio Climático

LCE: leche corregida por energía

LCG: leche corregida por grasa

LCGP: leche corregida por grasa y proteína

MS: materia seca

MS: materia seca

N: nitrógeno

N<sub>2</sub>: nitrógeno gas  
N<sub>2</sub>O: óxido nitroso  
NH<sub>3</sub>: amoníaco  
NNA: nitrógeno no amoniacal  
NNP: nitrógeno no proteico  
NOr: nitrógeno en orina  
NO<sub>3</sub><sup>-</sup>: nitrato  
Nr: nitrógeno reactivo  
NT: nitrógeno total  
NUL: nitrógeno ureico en leche  
NUOr: nitrógeno ureico en orina  
NUS: nitrógeno ureico en sangre  
P: fósforo  
PB: proteína bruta  
PBL: proteína bruta en leche  
PDR: proteína degradable en el rumen  
PM: proteína metabolizable  
PMo: proteína microbiana  
PNDR: proteína no degradable en el rumen  
PV: peso vivo  
RBT: recuento de bacterias totales  
RCS: recuento de células somáticas  
SF<sub>6</sub>: hexafluoruro de azufre  
SNG: sólidos no grasos  
Y<sub>m</sub>: factor de conversión del metano entérico (proporción de EB consumida que se pierde como CH<sub>4</sub>)

# ÍNDICE

<b>DEDICATORIA .....</b>	<b>II</b>
<b>AGRADECIMIENTOS .....</b>	<b>III</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>V</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>IX</b>
<b>ABREVIATURAS.....</b>	<b>XIII</b>
<b>ÍNDICE.....</b>	<b>XV</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS.....</b>	<b>XVII</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS.....</b>	<b>XX</b>
<b>CAPÍTULO 1 - INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
1.1. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	3
1.2.REFERENCIAS .....	5
<b>CAPÍTULO 2 –REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>10</b>
2.1. Introducción.....	10
2.2 Situación del sector lácteo .....	11
2.3 El impacto ambiental de los sistemas lecheros .....	16
2.3.1 El impacto ambiental del nitrógeno .....	17
2.4 Digestión proteica y metabolismo del nitrógeno en vacas lecheras .....	22
2.5 Estrategias de alimentación para mejorar la utilización del nitrógeno.....	30
2.5.1 Implicancias sobre la emisión de metano .....	37
2.5.2 Implicancias sobre el balance de nitrógeno a nivel sistema.....	41
2.6 Utilización del nitrógeno ureico en leche como herramienta para la gestión del nitrógeno.....	43
2.7 Niveles de proteína en las dietas en vacas lecheras y su eficiencia en el uso del nitrógeno y emisión de metano entérico en tambos de Argentina .....	46
2.8 Referencias .....	51
<b>CAPÍTULO 3 - REVISIÓN SISTEMÁTICA: Consumo de proteína en vacas lecheras y su efecto sobre la producción de leche, la eficiencia de uso del nitrógeno y la emisión de metano entérico.....</b>	<b>79</b>
3.1. INTRODUCCIÓN.....	79
3.2. MATERIALES Y MÉTODOS .....	80
3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	81
3.3.1. Análisis de componentes principales .....	84
3.3.2. Análisis de conglomerados .....	85
3.3.3. Regresiones aleatorias.....	86
3.4. CONCLUSIONES.....	92
3.5. REFERENCIAS .....	92
<b>CAPÍTULO 4 - Eficiencia en el uso del nitrógeno de la dieta y emisión de metano en vacas Holstein en lactancia alimentadas con dietas con diferentes niveles de proteína .....</b>	<b>100</b>
4.1. INTRODUCCIÓN.....	100

4.2. MATERIALES Y MÉTODOS .....	100
4.2.1. Animales y diseño experimental .....	101
4.2.2. Tratamientos experimentales y manejo de la alimentación .....	101
4.2.3. Mediciones, muestreo y análisis .....	105
4.2.4. Medición de metano entérico .....	107
4.2.5. Comparación económica .....	108
4.2.6. Análisis estadístico.....	109
4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	110
4.3.1. Características de las dietas.....	110
4.3.2. Consumo y digestibilidad aparente .....	110
4.3.3. Producción y composición de la leche.....	111
4.3.4. Utilización y destino del nitrógeno consumido.....	113
4.3.5. Emisión de metano entérico.....	116
4.3.6. Parámetros económicos .....	117
4.4. CONCLUSIONES.....	118
4.5. REFERENCIAS .....	124
<b>CAPÍTULO 5 - Efecto del nivel de proteína en la dieta sobre la fermentación ruminal en un sistema de doble flujo continuo .....</b>	<b>133</b>
5.1. INTRODUCCIÓN.....	133
5.2. MATERIALES Y MÉTODOS .....	134
5.2.1. Diseño experimental y dietas .....	135
5.2.2. Condiciones de los fermentadores .....	137
5.2.3. Mediciones, muestreo y análisis .....	139
5.2.4. Extracción de ADN y PCR .....	142
5.2.5. Análisis estadístico y cálculos .....	143
5.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	146
5.3.1. Composición de las dietas y digestibilidad de los nutrientes.....	146
5.3.2. pH, AGV y metano .....	147
5.3.3. Metano y recuento de bacterias totales y metanogénicas .....	151
5.3.4. Metabolismo del nitrógeno .....	152
5.4. CONCLUSIONES.....	154
5.5. REFERENCIAS .....	155
<b>CAPÍTULO 6: DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES.....</b>	<b>160</b>
6.1. DISCUSIÓN GENERAL .....	160
6.2. INVESTIGACIÓN FUTURA .....	164
6.3. CONCLUSIONES.....	166
6.4. REFERENCIAS .....	167

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1: Tasa anual de disminución de unidades productivas en Argentina, comparado con otros países lecheros (2002 -2019) (Fuente: OCLA, 2019).....	12
Figura 2.2: Evolución nacional de la producción de leche en Argentina (Fuente: SAGPyA, 2018) .....	13
Figura 2.3: Mapa de países exportadores claves de productos lácteos (Fuente: FIL-IDF, 2018)	13
Figura 2.4: Distribución de tambos en Argentina (Fuente: SAGPyA, 2018) .....	14
Figura 2.5: Transformaciones de nitrógeno en sistemas lecheros (Fuente: Adaptado de Hendricks, 2016) .....	19
Figura 2.6: Esquema de funcionamiento hidrogeológico en llanuras. (Fuente: Herrero y Tieri, 2014) .....	20
Figura 2.7: Esquema del metabolismo del N en vacas lecheras (Fuente: adaptado de Sarraseca <i>et al.</i> , 1998, Huntington <i>et al.</i> , 1989, Ruiz <i>et al.</i> 2002, Marini <i>et al.</i> , 2004, Wickersham <i>et al.</i> , 2008) .....	25
Figura 2.8: Producción total de urea diaria (diamantes) y tasa de ingreso de urea al intestino (cuadrados) en relación con el nitrógeno consumido en g/día (A) o el consumo de N por kilogramo de PV0,75 (B) en ganado en crecimiento (símbolos sólidos) y en vacas en lactancia (símbolos abiertos) (Adaptado de Reynolds y Kristensen, 2008) .....	27
Figura 2.9: Relación entre la ingesta total de nitrógeno, N en leche y excreción de N fecal y urinario (Fuente: Dijkstra <i>et al.</i> , 2018).....	28
Figura 2.10: Relación entre la proteína bruta (PB) de la dieta con la producción de leche y la eficiencia en el uso del nitrógeno (EUN) (Fuente: Powell y Rotz, 2015) .....	30
Figura 2.11: Recomendación de dietas con diferentes niveles de proteína bruta (PB) en distintos momentos de la lactancia (Fuente: Wu y Satter, 2000).....	33
Figura 2.12: Efecto de la degradabilidad de la proteína en la excreción de N en heces y orina en vacas lecheras a inicio y mitad de lactancia (Kebreab <i>et al.</i> , 2002) .....	34
Figura 2.13: Relación entre el consumo de carbohidratos solubles (CHOs) y proteína bruta (PB) de la dieta y la eficiencia en el uso del nitrógeno (EUN) en vacas lecheras (Fuente: adaptado de Keim y Anrique, 2011) .....	36
Figura 2.14: Relación entre el nivel de producción de leche con respecto a la eficiencia de la alimentación y la eficiencia en el uso del N en leche (Fuente: Dijkstra <i>et al.</i> , 2013b) .....	37

Figura 2.15: Relación entre el consumo de materia seca (kg/d) y la emisión de metano (MJ / d) en vacas lecheras (Fuente: Kebreab <i>et al.</i> , 2010) .....	38
Figura 2.16: Relación entre la excreción simulada de N y la emisión de metano entérico en vacas lecheras de lactancia media con dietas basadas en silaje de pastura (Fuente: Dijkstra <i>et al.</i> , 2010) .....	40
Figura 2.17: Pérdidas de N en la gestión de excretas (Fuente: adaptado de Pinder <i>et al.</i> , 2004)	42
Figura 2.18: Relación entre NUL y EUN de la dieta (Fuente: Powell y Rotz, 2015) .....	45
Figura 2.19: Excreción de nitrógeno en función del nivel de proteína bruta (PB) de la dieta en 122 tambos de la Región Pampeana, Argentina .....	48
Figura 2.20: Frecuencias relativas de los niveles de EUN (%) de la dieta en vacas en ordeño en 122 tambos de la Región Pampeana, Argentina .....	49
Figura 2.21: Eficiencia en el uso del N en función del nivel de proteína bruta (PB) de la dieta según el sistema de alimentación en 122 tambos de la Región Pampeana, Argentina .....	50
Figura 2.22: Emisión de metano entérico (g / VO / día), en función de la eficiencia en el uso del N según el sistema de alimentación en 122 tambos de la Región Pampeana, Argentina .....	50
Figura 3.1: Representación gráfica del análisis de componentes principales de las variables utilizadas en el trabajo .....	84
Figura 3.2: Distribución de frecuencias obtenidas en las regresiones aleatorias para el caso de la pendiente de producción de leche (A) y la eficiencia en el uso del nitrógeno (B) .....	87
Figura 3.3: Regresiones individuales en cada uno de los ensayos evaluados y regresión cuadrática general obtenida del análisis grupal .....	89
Figura 3.4: Regresiones individuales en cada uno de los trabajos evaluados .....	90
Figura 3.5: Regresiones individuales en cada uno de los ensayos evaluados y regresión lineal general obtenida del análisis grupal .....	91
Figura 4.1: Calendario resumen de etapas y muestreo de ensayo con animales .....	104
Figura 5.1: Componentes de los fermentadores de doble flujo continuo utilizados en el experimento .....	135
Figura 5.2: Calendario resumen de etapas y muestreo de ensayo con fermentadores .....	139
Figura 5.3: Alimentación y horario de muestreo: alimentación (08:00 y 20:00 hs); muestreo de fase gaseosa para análisis de metano (7:55, 9:00, 10:00, 19:55, 21:00 y 22:00 hs); muestreo de filtrado para análisis de N amoniacal y AGV (10:00 y 21:00 hs). Adaptado de Vibart et al. (2007) .....	140
Figura 5.4: Efecto de los niveles de proteína bruta (PB) en el pH ruminal en diferentes momentos después de la alimentación en un sistema de doble flujo continuo .....	149

Figura 5.5: Efecto de los niveles de proteína bruta (PB) sobre AGV en diferentes momentos después de la alimentación en un sistema de doble flujo continuo .....	150
Figura 5.6: Efecto de los niveles de proteína bruta (PB) en la producción de metano en diferentes momentos después de la alimentación en un sistema de doble flujo continuo .....	152
Figura 6.1: Relación entre el consumo de nitrógeno y la excreción de nitrógeno en heces (6.1a), orina (6.1b) y leche (6.1c) en vacas lecheras que recibieron un bajo, medio o alto nivel de proteína bruta en la dieta .....	163

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1: Consumo, excreción y concentraciones de N en plasma y leche .....	28
Tabla 2.2: Caracterización de variables productivas y de emisión de metano en 122 tambos analizados (Proyecto INTA 1126043) de la Región Pampeana, Argentina .....	48
Tabla 3.1: Caracterización de variables productivas y de emisión de metano en 222 dietas evaluadas en 53 ensayos y 222 dietas con diferente contenido de PB de la dieta entregada a vacas en lactancia .....	83
Tabla 3.2: Medias y desvío estándar por grupo de conglomerado obtenido según las variables evaluadas .....	85
Tabla 3.3: Regresiones lineales obtenidas en función del nivel de PB en 53 ensayos y 222 dietas con diferente contenido de PB de la dieta entregada a vacas en lactancia .....	86
Tabla 4.1. Composición química y contenido de energía de los ingredientes utilizados en las dietas experimentales (los datos son valores promedio y desvío estándar de 7 sub-muestras) .....	102
Tabla 4.2. Ingredientes y composición química de las dietas experimentales ofrecidas a vacas lecheras Holando Argentino en lactancia .....	103
Tabla 4.3. Precios medios para cada ingrediente utilizado en las dietas experimentales (expresado en valor dólar estadounidense/kg MS) .....	108
Tabla 4.4. Consumo, excreción y digestibilidad aparente de los nutrientes en vacas que consumieron dietas con bajo, medio o alto nivel proteína bruta .....	119
Tabla 4.5. Consumo de materia seca, producción de leche y composición de la leche en vacas que consumieron dietas con bajo, medio o alto nivel de proteína bruta .....	120
Tabla 4.6. Consumo y partición del N y emisión de metano entérico en vacas que consumieron dietas con bajo, medio o alto nivel de proteína bruta .....	121
Tabla 4.7. Variables económicas en vacas alimentadas con bajo, medio o alto nivel de proteína bruta .....	123
Tabla 5.1: Composición química de los ingredientes utilizados en las dietas experimentales. Los valores de degradabilidad de la fracción de proteína bruta fueron evaluados mediante Daisy II. ....	136
Tabla 5.2: Ingredientes y composición química de las dietas experimentales utilizadas en los fermentadores de doble flujo continuo. ....	136
Tabla 5.3: Composición mineral de la saliva artificial utilizada en los fermentadores de doble flujo continuo .....	138

Tabla 5.4: PCR primers utilizados en el estudio .....	143
Tabla 5.5: Efecto de la cantidad de proteína en la dieta sobre la digestibilidad aparente y real de los nutrientes durante la fermentación en un sistema de doble flujo continuo.....	147
Tabla 5.6: Efecto de la cantidad de proteína en la dieta sobre el pH y la concentración de AGV durante la fermentación en un sistema de doble flujo continuo .....	148
Tabla 5.7: Efecto de la cantidad de proteína en la dieta sobre la emisión de CH <sub>4</sub> , el recuento de bacterias totales y metanogénicas durante la fermentación en un sistema de doble flujo continuo .....	151
Tabla 5.8. Efecto de la cantidad de proteína en la dieta sobre el metabolismo del nitrógeno ruminal durante la fermentación en un sistema de doble flujo continuo .....	153

## CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN GENERAL

A nivel global, se espera que la demanda de proteína de origen animal se incremente de manera constante debido, entre otros factores, al aumento de la población mundial y a los procesos de mejora económica y urbanización en China y países del sudeste asiático. Comparado con el año 2000, FAO (2011) pronosticó para el año 2050 un incremento de más del 100% en el consumo de carne y leche. Si bien este hecho puede ser favorable para países como Argentina, la producción animal se encuentra transitando una situación compleja, dada por el desafío de atender una demanda creciente de productos de origen animal con el compromiso de disminuir el impacto ambiental de su producción. En este contexto, el productor agropecuario se enfrenta al desafío de mejorar la eficiencia de uso de los recursos disponibles y, al mismo tiempo, y reducir la contaminación ambiental derivada de la producción.

Las actividades agropecuarias han sido partícipes del aumento en el volumen de gases de efecto invernadero (GEI), principalmente en forma de metano (CH<sub>4</sub>), óxido nitroso (N<sub>2</sub>O) y dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) (Mohammed *et al.*, 2019). Según la Organización de Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura (FAO), la ganadería mundial sería responsable del 9% de las emisiones globales de CO<sub>2</sub>, del 35-40% de las emisiones de CH<sub>4</sub> y de aproximadamente el 19 % de las de N<sub>2</sub>O (Steinfeld *et al.*, 2006; Faverin *et al.*, 2015). Comparado con el CO<sub>2</sub>, que es un contaminante climático de larga duración (hasta 200 años de presencia en la atmósfera), el CH<sub>4</sub> es de corta duración, pero atrapa 84 veces más calor que el CO<sub>2</sub>, después de haber sido liberado al aire. Por lo tanto, es clave la posibilidad de reducir los impactos negativos en el clima por parte de este GEI. La misma situación ocurre para el caso del N<sub>2</sub>O, cuyo potencial de calentamiento global es 296 veces mayor que el del CO<sub>2</sub>, lo que lo convierte en un potente GEI (IPCC, 2001).

Desde los años 90, las emisiones de Argentina se han incrementado lenta, pero sostenidamente, y los sectores de agricultura y energía fueron los que más contribuyeron a las emisiones de GEI (Climate Transparency, 2017). Si bien la República Argentina es responsable de un pequeño porcentaje de las emisiones globales de GEI (0,76%) y se ubica en el puesto 19 entre los países emisores (Friedrich *et al.*, 2017; Faverin *et al.*, 2019), al ratificar la Convención Marco de las Naciones Unidas sobre el Cambio Climático (CMNUCC), asumió la obligación de informar todo lo relevante para el logro de los objetivos de la Convención, en particular aquello relacionado con sus inventarios nacionales de GEI y programas nacionales que contengan medidas para disminuir las emisiones y mitigar el cambio climático. El sector ganadero nacional, y

particularmente la ganadería bovina de base pastoril, es considerada responsable de la mayor parte de las emisiones de GEI de este sector. Si bien el sector energía es el mayor contribuyente a las emisiones de GEI a nivel nacional, según el inventario nacional del año 2016, el sector ganadero contribuye con 21,6% del total de las emisiones nacionales y los bovinos son responsables de casi 53% de estas emisiones, principalmente a través de CH<sub>4</sub> entérico (SAyDS, 2019).

Existen diversos impactos ambientales asociados a la cadena láctea, pero el punto crítico está en la producción primaria (IDF, 2009; González-García *et al.*, 2013; Guerci *et al.*, 2013; Chen y Holden, 2018). Los sistemas lecheros son una fuente de emisiones de GEI, en forma de CH<sub>4</sub> debido a la fermentación entérica, y CH<sub>4</sub> y N<sub>2</sub>O de las excretas. Aunque la emisión CH<sub>4</sub> es un motivo de preocupación a nivel mundial, debido a que es uno de los principales GEI, la problemática ambiental relacionada al nitrógeno (N) debe ser considerada (Tamminga, 1992; Ledgard *et al.*, 2019).

El N es un elemento indispensable en la producción agropecuaria. La producción de rumiantes contribuye con las emisiones de N al ambiente, y su uso ineficiente puede derivar en pérdidas al ambiente (Oenema *et al.*, 2012), principalmente amoníaco (NH<sub>3</sub>) y N<sub>2</sub>O al aire (Sutton *et al.*, 2011), nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) al agua subterránea y N particulado a las aguas superficiales (Herrero y Gil, 2008; Cameron *et al.*, 2013; Ledgard *et al.*, 2019). Los rumiantes tienen una eficiencia en el uso del N de la dieta (EUN) variable pero baja. La EUN, definida como el nitrógeno retenido en el producto animal expresado como porcentaje o proporción del N ingerido (Wilkinson y Audsley, 2013), es alrededor 25% en promedio (Kohn *et al.*, 2005; Huhtanen y Hristov, 2009; Calsamiglia *et al.*, 2010; Sánchez Chopa *et al.*, 2016; Herremans *et al.*, 2020), pero podría ser 30-35% en situaciones más eficientes de producción (Calsamiglia *et al.*, 2010; Powell y Rotz, 2015; Powell *et al.*, 2017). Como consecuencia de la baja EUN, una gran proporción del N consumido se elimina en las excretas, especialmente en orina (Edouard *et al.*, 2016), convirtiendo al ganado lechero en una fuente importante de contaminación del agua y el aire. Esta situación ha llevado a la evaluación de dietas con menor contenido de proteína bruta, PB (van der Stelt *et al.*, 2008; Dijkstra *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2012; Pfeffer *et al.*, 2016), a través del aumento de la eficiencia de utilización del N dietario (Gregorini *et al.*, 2016, Almeida *et al.*, 2020).

La sobrealimentación de PB es una práctica corriente en sistemas lecheros, como un medio para asegurar una mayor producción de leche por vaca. Sin embargo, dicha estrategia no sólo aumenta los costos de alimentación, sino que además incrementa el impacto ambiental (Brown, 2014; Abbasi *et al.*, 2019). No obstante, disminuir la concentración de PB en la dieta puede resultar

en un suministro de proteína metabolizable (PM, proteína verdadera que es digerida post ruminantemente y el componente de AA absorbidos por el intestino) inferior a los requerimientos animales (NRC, 2001; Lee *et al.*, 2012). Esta situación puede comprometer la productividad de la vaca al disminuir la producción de leche y su contenido proteico (Cabrita *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2012). Otro aspecto a considerar, cuando se pretende mejorar la EUN mediante la alimentación, es la comprensión de sus efectos sobre la emisión de CH<sub>4</sub> (Gregorini *et al.*, 2016; Kidane *et al.*, 2018) y la posibilidad de que exista un riesgo de “pollution swapping” (Garrett *et al.*, 2019), término en inglés que se refiere a un efecto secundario que puede existir al implementarse alguna estrategia que permina disminuir el impacto de un contaminante. Dicho efecto puede resultar en el aumento no deseado de otro contaminante, y/o el aumento no deseado de la emisión del contaminante objetivo en otro lugar (Oenema y Velthof, 2007). Con frecuencia, las opciones de mitigación dirigidas a mejorar la EUN y disminuir la excreción de N al ambiente, pueden resultar en un aumento en la emisión de CH<sub>4</sub> (Dijkstra *et al.*, 2011), y actualmente existe poca información respecto a dicho efecto (Gregorini *et al.*, 2016; Garret *et al.*, 2019).

## **1.1. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS**

El desafío de atender una demanda creciente de productos de origen animal con pocas posibilidades de aumentar la superficie de tierra agrícola, lleva a la intensificación de los sistemas de producción de leche. Este reto se suma al compromiso de disminuir el impacto ambiental de dicha producción.

Los rumiantes desempeñan un papel clave en la seguridad alimentaria por la capacidad única que tienen para convertir recursos vegetales que los humanos no podrían consumir en proteína de origen animal de alta calidad (Gill *et al.*, 2010; Dijkstra *et al.*, 2013; Herremans *et al.*, 2020). Sin embargo, ese proceso va acompañado por una contribución directa a la emisión de GEI y a la contaminación ambiental por N. La mejora de la EUN y la reducción de las emisiones de GEI se encuentran entre los principales desafíos para el futuro de la ganadería (Steinfeld *et al.*, 2006; Galloway *et al.*, 2008; Almeida *et al.*, 2020).

Este hecho toma particular relevancia en sistemas de producción característicos de la Argentina, y representa un desafío para lograr alternativas de manejo de la alimentación que permitan reducir la emisión y/o la intensidad de emisión tanto de CH<sub>4</sub> como de N<sub>2</sub>O. Por otra parte, la posibilidad de generar información sobre emisiones de los principales GEI en sistemas ganaderos de producción de leche característicos de nuestro país permitirá, por un lado, reducir la

incertidumbre de los inventarios nacionales, a través de la generación de factores de emisión locales, y por otro, disponer de información local sobre el potencial de reducción de emisiones de GEI mediante el manejo de la dieta en la producción primaria de leche.

En este contexto, este trabajo de tesis ha indagado en los problemas descriptos, con el propósito de obtener información para la lechería argentina, que sea de utilidad para llevar a cabo estrategias de transferencia hacia los productores que promuevan prácticas de manejo adecuadas para lograr sistemas de producción de leche sustentables.

#### *OBJETIVO GENERAL*

Determinar el efecto de distintos niveles de proteína bruta en la dieta sobre la productividad animal, la fermentación ruminal, el destino del N consumido y su impacto ambiental en vacas Holando Argentino en lactancia.

#### *OBJETIVOS ESPECÍFICOS*

- Evaluar los niveles de proteína bruta en las dietas utilizadas en vacas en ordeño y la eficiencia en el uso del nitrógeno de la dieta en sistemas de producción de leche representativos a nivel nacional.
- Desarrollar una revisión sistemática y un análisis global de las relaciones integrales de las variables bajo estudio (consumo de N, producción de leche, excreción de N en leche, en orina y en heces, N retenido, N ureico en leche y la eficiencia en el uso del N), en base a trabajos de investigación sobre ensayos con vacas lecheras que incluyeron dietas con diferentes niveles de proteína bruta.
- Evaluar el efecto de dietas con distinto contenido N sobre el balance de N corporal total (consumo de N; retención de N en tejidos corporales y leche; excreción de N en orina y materia fecal) y la eficiencia en el uso del N de la dieta.
- Describir la respuesta marginal de eficiencia entre la producción de leche y la oferta de N en vacas lecheras alimentadas con dietas con distinto contenido de N.
- Cuantificar la emisión de metano entérico en vacas lecheras alimentadas con dietas con distinto contenido de N.
- Evaluar *in vitro* el efecto de dietas con distinto contenido de N sobre la fermentación ruminal, la eficiencia de síntesis de masa microbiana y la población microbiana en un sistema de fermentadores de doble flujo continuo.

## HIPÓTESIS

Alimentar vacas en lactancia con dietas con un contenido de N menor al recomendado incrementará la eficiencia de retención del N dietario en proteína en leche y disminuirá la excreción de N al ambiente, sin afectar la producción de leche.

### 1.2. REFERENCIAS

- Abbasi, I.H.R.; Abbasi, F.; Liu, L.; Bodinga, B.M.; Abdel-Latif, M.A.; Swelum, A.A.; Abdalla, M.; Mohamed, E.; Cao, Y. (2019). Rumen-protected methionine a feed supplement to low dietary protein: effects on microbial population, gases production and fermentation characteristics. *AMB Expr.* **9**, 93.
- Almeida, J.G.R.; Dall-Orsoletta, A.C.; Oziemblowski, M.M.; Michelon, G.M.; Bayer, C.; Edouard, N.; Ribeiro-Filho, H.M.N. (2020). Carbohydrate-rich supplements can improve nitrogen use efficiency and mitigate nitrogenous gas emissions from the excreta of dairy cows grazing temperate grass. *Animal.* **7**, 1-12.
- Brown, A.N. (2014). Effects of Oscillating Crude Protein Content of Dairy Cow Diets. Thesis Presented in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree Master of Science in the Graduate School of The Ohio State University. [https://etd.ohiolink.edu/!etd.send\\_file?accession=osu1406190341&disposition=inline](https://etd.ohiolink.edu/!etd.send_file?accession=osu1406190341&disposition=inline).
- Cabrita, A.R.J.; Dewhurst, R.J.; Melo, D.S. Mororby; J.M.; Fonseca A.J.M. (2011). Effects of dietary protein concentration and balance of absorbable amino acids on productive responses of dairy cows fed corn silage-based diets. *J. Dairy Sci.* **94**, 4647-4656.
- Calsamiglia, S.; Ferret, A.; Reynolds, C.K.; Kristensen, N.B.; van Vuuren, A.M. (2010). Strategies for optimizing nitrogen use by ruminants. *Animal.* **47**, 1184–1196.
- Chen, W.; Holden, N.M. (2018). Bridging environmental and financial cost of dairy production: A case study of Irish agricultural policy. *Science of the Total Environment.* **615**, 597–607.
- Climate Transparency. (2017). Brown to green: the G20 transition to a low-carbon economy. Argentina profile. <https://www.climate-transparency.org/g20-climate-performance/g20report2017>.

- Dijkstra, J.; Oenema, O.; Bannink, A. (2011). Dietary strategies to reducing N excretion from cattle: implications for methane emissions. *Current Opinion in Environmental Sustainability*. **3**, 414–422.
- Dijkstra, J.; France, J.; Ellis, J.L.; Strathe, A.B.; Kebreab, E.; Bannink, A. (2013). Production efficiency of ruminants: feed, nitrogen and methane. In: Kebreab, E. (editor), Sustainable animal agriculture. CAB International, Wallingford, UK, in press.
- Dijkstra, J.; Bannink, A.; Bosma1, P.M.; Lantinga, E.A.; Reijts, J.W. (2018). Modeling the Effect of Nutritional Strategies for Dairy Cows on the Composition of Excreta Nitrogen. *Front. Sustain. Food Syst.* 2:63.
- Edouard; N.; Hassouna, M.; Robin, P.; Faverdin, P. (2016). Low degradable protein supply to increase nitrogen efficiency in lactating dairy cows and reduce environmental impacts at barn level. *Animal*. **10(2)**, 212–220.
- FAO. (2011). World Livestock 2011 – Livestock in Food Security. FAO, Rome.
- Faverin, C.; Gratton, R.; Machado, C.F. (2015). Emisiones de gases de efecto invernadero en sistemas de producción de carne vacuna de base pastoril. Revisión bibliográfica. *Rev. Arg. Prod. An.* **34 (1)**, 33-54.
- Faverin, C.; Tieri, M.P.; Herrero, M.A. (2019). Metodologías de cálculo de emisiones de gases de efecto invernadero en ganadería bovina. Capítulo 5. *Rev. Arg. Prod. An.* **39 (2)**, 87-104.
- Friedrich, J.; Ge, M.; Pickens, A. 2017. This Interactive Chart Explains World’s Top 10 Emitters, and How They’ve Changed. World Resources Institute. <http://www.wri.org/print/47041>.
- FAO. (2011). World Livestock 2011 – Livestock in Food Security. FAO, Rome.
- Galloway, J.N.; Townsend, A.R.; Erisman, J.W.; Bekunda, M.; Cai, Z.; Freney, J.R.; Martinelli, L.A.; Seitzinger, S.P.; Sutton, M.A. (2008.) Transformation of the nitrogen cycle: recent trends, questions, and potential solutions. *Science*. **320**, 889–892.
- Garrett, K.; Beck, M.R.; Gregorini, P. (2019). Strategic feeding management to mitigate enteric methane emissions and urinary nitrogen excretion. *New Zealand Journal of Animal Science and Production*. **79**, 20-25.

- Gill, M.; Smith, P.; Wilkinson, J.M. (2010). Mitigating climate change: the role of domestic livestock. *Animal*. **4**, 323–333.
- González-García, S.; Castanheira, E.G.; Dias, A.C.; Arroja, L. (2013). Using Life Cycle Assessment methodology to assess UHT milk production in Portugal. *Sci. Total Environ.* **442**, 225–234.
- Gregorini, P.; Beukes, P.C.; Dalley, D.; Romera, A.J. (2016). Screening for diets that reduce urinary nitrogen excretion and methane emissions while maintaining or increasing production by dairy cows. *Sci. Total Environ.* **551–552**, 32–41.
- Guerci, M.; Knudsen, M.T.; Bava, L.; Zucali, M.; Schönbach, P.; Kristensen, T. (2013). Parameters affecting the environmental impact of a range of dairy farming systems in Denmark, Germany and Italy. *J. Clean. Prod.* **54**, 133–141.
- Herremans, S.; Vanwindekens, F.; Decruyenaere, V.; Beckers, Y.; Froidmont, E. (2020). Effect of dietary tannins on milk yield and composition, nitrogen partitioning and nitrogen use efficiency of lactating dairy cows: A meta-analysis. *J Anim Physiol Anim Nutr.* **00**:1–10.
- Herrero, M.A.; Gil, S.B. (2008). Consideraciones ambientales de la intensificación en producción animal. *Ecol. Austral.* **18 (3)**, 273-289.
- Hristov, A.N.; Giallongo, F. (2014). Feeding protein to dairy cows - what should be our target? Proceedings of the 23<sup>rd</sup> Tri-State Dairy Nutrition Conference, Fort Wayne, Indiana, USA. **34**, 75-84.
- Huhtanen, P.; Hristov, A.N. (2009). A meta-analysis of the effects of dietary protein concentration and degradability on milk protein yield and milk N efficiency in dairy cows. *J. Dairy Sci.* **92**, 3222–3232.
- IDF (2009). Environmental/Ecological Impact of the Dairy Sector. Bulletin of the International Dairy Federation 436/2009. IDF, Brussels, Belgium.
- IPCC, (2001). Climate change 2001: the scientific basis. In: Houghton, J.T., Ding, Y., Griggs, D.J., Noguer, M., van der Linden, P.J., Dai, X., Maskell, K., Johnson, C.A. (Eds.), Contribution of Working Group I to the Third Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge University Press, Cambridge, New York, 881 pp.

- Kohn, R.A.; Dinneen, M.M.; Russek-Cohen, E. (2005). Using blood urea nitrogen to predict nitrogen excretion and efficiency of nitrogen utilization in cattle, sheep, goats, horses, pigs, and rats. *J. Anim. Sci.* **83**, 879-889.
- Ledgard, S.F.; Wei, S.; Wang, X.; Falconer, S.; Zhang, N.; Zhang, X.; Ma, L. (2019). Nitrogen and carbon footprints of dairy farm systems in China and New Zealand, as influenced by productivity, feed sources and mitigations. *Agricultural Water Management*. **213**, 155–163.
- Lee, C.; Hristov, A.N.; Heyler, K.S.; Cassidy, T.W.; Long, M.; Corl, B.A.; Karnati, S.K.R. (2011). Effects of dietary protein concentration and coconut oil supplementation on nitrogen utilization and production in dairy cows. *J. Dairy Sci.* **94**, 5544–5557.
- Lee, C.; Hristov, A.N.; Heyler, K.S.; Cassidy, T.W.C.; Lapierre, H.; Varga, G.A.; Arys, C.P. (2012). Effects of metabolizable protein supply and amino acid supplementation on nitrogen utilization, milk production, and ammonia emissions from manure in dairy cows. *J. Dairy Sci.* **95**(5), 5253–5268.
- Lemos, D.G.V. (2015). Evaluación de las emisiones entéricas de metano en vacas lecheras bajo trópico alto con o sin la inclusión de botón de oro (*Tithonia diversifolia*). Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de: Magíster en Ciencias Agrarias Universidad Nacional de Colombia Facultad de Ciencias Agrarias, Departamento de Producción Animal Medellín, Colombia. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/59075>.
- Mohammed, S.; Alsafadi, K.; Takács, I.; Harsányi, E. (2019). Contemporary changes of greenhouse gases emission from the agricultural sector in the EU-27. *Geology, Ecology, and Landscapes*, 1–6.
- NRC (2001). Nutrient Requirements of Dairy Cattle. 7th rev. ed. Natl. Acad. Sci., Washington, D.C.
- Oenema, O. y Velthof, G.L. (2007). Analysis of international and European policy instruments: pollution swapping. <https://edepot.wur.nl/19080>
- Pfeffer, E.; Schuba, J.; Südekum, K.H. (2016). Nitrogen supply in cattle coupled with appropriate supply of utilisable crude protein at the duodenum, a precursor to metabolisable protein. *Archives of animal nutrition*. **70**(4), 293–306.

- Powell, J.M.; Rotz, C.A. (2015). Measures of Nitrogen Use Efficiency and Nitrogen Loss from Dairy Production Systems. *J. Environ. Qual.* **44**, 336–344.
- Powell, J.M.; Barros, T.; Danesc, M.; Aguerre, M.; Wattiaux, M.; Reed, K. (2017). Nitrogen use efficiencies to grow, feed, and recycle manure from the major diet components fed to dairy cows in the USA. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. **239**, 274–282.
- SAyDS. (2019). Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable. Tercer informe bienal de actualización de la República Argentina a la convención marco de las naciones unidas sobre el cambio climático. <https://unfccc.int/documents/201965>. Visitado 8 de abril de 2020.
- Sánchez Chopa, F.; Nadin, L.B.; Agnelli, L.; Trindade, J.K.; Gonda, H.L. (2016). Nitrogen balance in Holstein steers grazing winter oats: effect of nitrogen fertilization. *Animal Production Science*. **56**, 2039–2046.
- Steinfeld, H.; Gerber, P.; Wassenaar, T.; Castel, V.; Rosales, M.; Haan, C.D. (2006). *Livestock's Long Shadow - Environmental Issues and Options*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
- Tamminga, S. (1992). Nutrition management of dairy cows as a contribution to pollution control. *J Dairy Sci*. **75**, 345–357.
- Van der Stelt, B.; van Vliet, P.C.J.; Reijs, J.W.; Temminghoff, E.J.M.; van Riemsdijk, W.H. (2008). Effects of dietary protein and energy levels on cow manure excretion and ammonia volatilization. *J. Dairy Sci*. **91**, 4811–4821.
- Wilkinson, J.M.; Audsley, E. (2013). Options from life-cycle analysis for reducing greenhouse gas emissions from crop and livestock production systems. *International Journal of Agricultural Management*. **2**, 70-80.

## **CAPÍTULO 2 – REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA: EFICIENCIA EN EL USO DEL NITRÓGENO POR VACAS LECHERAS Y SUS EFECTOS AMBIENTALES.**

### **2.1. INTRODUCCIÓN**

Uno de los objetivos de la alimentación de rumiantes es proporcionar la cantidad de nutrientes que el animal necesita para alcanzar un determinado nivel de producción (Keim y Anrique, 2011). Cualquier deficiencia de nutrientes dará como resultado una menor producción, mientras que un exceso de nutrientes generará impactos negativos sobre los costos de producción, los animales y el ambiente (Hristov y Jouany, 2005; Pacheco *et al.*, 2008). Los sistemas de producción de rumiantes son cada vez más desafiados en términos ambientales (O'mara, 2011), por lo tanto, la cuestión ambiental ha recibido mayor atención en los últimos años (Steinfeld *et al.*, 2006; Fanchone *et al.*, 2014; Niu *et al.*, 2016).

La mayoría de los problemas ambientales están relacionados a la alimentación, al manejo de las excretas y, en consecuencia, al manejo de los nutrientes (Herrero *et al.*, 2006; Dijkstra *et al.*, 2013a). Varios estudios han informado de los efectos ambientales perjudiciales de la producción de rumiantes, como el cambio climático debido a las emisiones de GEI y el deterioro de la calidad del agua debido a la lixiviación de nutrientes (FAO, 2006; Galloway *et al.*, 2008; Gerber *et al.*, 2013; Säll y Gren, 2015). Los nutrientes, principalmente el N y el fósforo (P), son un componente importante de la contaminación de las aguas superficiales, subterráneas y marinas, debido al daño que generan a los ecosistemas mediante la eutrofización y degradación (OCDE, 2018). El N se considera el elemento más crítico, y es el principal contaminante de interés en relación con los sistemas de producción de rumiantes. Además de otros GEI como el dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) y el metano (CH<sub>4</sub>), el N contribuye al impacto negativo sobre el ambiente por medio de la lixiviación de nitratos (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), volatilización de amoníaco (NH<sub>3</sub>) y las emisiones de N<sub>2</sub>O (Kebreab *et al.*, 2010).

Los rumiantes utilizan el N dietario con una determinada EUN (g N en leche / g N consumidos) la cual es generalmente baja, alrededor del 25% (Calsamiglia *et al.*, 2010; Herremans *et al.*, 2020). El metabolismo en el rumen ha sido identificado como el factor contribuyente más importante a la EUN (Bussink y Oenema, 1998). Generalmente, al aumentar en N suministrado en la dieta a los animales, se incrementa la excreción de N en las heces y la orina (Castillo *et al.*,

2000), las emisiones de  $\text{NH}_3$  aumentan (Dijkstra *et al.*, 2013a), junto con las emisiones de  $\text{N}_2\text{O}$  (Ryan *et al.*, 2011) y la lixiviación de  $\text{NO}_3^-$  (Ledgard *et al.*, 1999; Wilkinson y Garnsworthy, 2017).

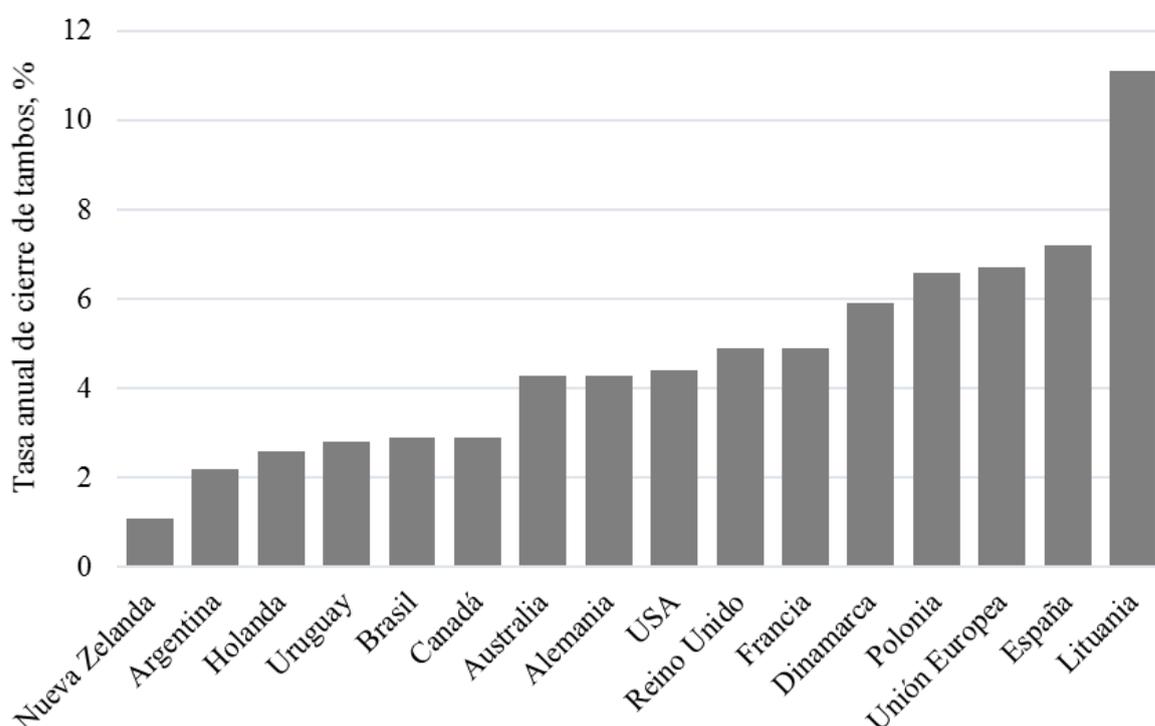
La preocupación por el impacto ambiental de la producción ganadera en general, y la lechera en particular, ha llevado a la evaluación de dietas alternativas para reducir la excreción de N, mediante el aumento de la EUN (Gregorini *et al.*, 2016; Almeida *et al.*, 2020). En general, dietas con bajos contenidos de N, permite que una mayor proporción del N de la dieta sea convertida en N microbiano. Esto permite una menor excreción de N y una mayor retención de N en el animal o N en leche. Teniendo en cuenta esta situación, entre los principales desafíos de la investigación actual, se incluye la evaluación de estrategias nutricionales para reducir la cantidad de PB en dietas de vacas lecheras para minimizar la pérdida de N al ambiente (Wu *et al.*, 2001; Wattiaux y Karg, 2004; Kebreab *et al.* 2010; Sutter *et al.*, 2017; Van Amburgh *et al.*, 2018; Kidane *et al.*, 2018; Stevens, 2019; Guo *et al.*, 2019; Nichols *et al.*, 2019) sin afectar la producción de leche.

Al mismo tiempo, se trata de reducir la contaminación por nutrientes y las emisiones de GEI, lo que ha dado lugar a diversos acuerdos internacionales, como por ejemplo el protocolo de Kioto (Kebreab *et al.*, 2010). La reducción del contenido de proteínas en la dieta disminuye la excreción de N, pero el efecto sobre la producción de metano es menos claro (Dijkstra *et al.*, 2011). Actualmente, la emisión de  $\text{CH}_4$  es un motivo de preocupación a nivel mundial, debido a que es uno de los principales GEI, junto con el  $\text{N}_2\text{O}$ . Existe consenso en que la excreción de N y  $\text{CH}_4$  depende de la manipulación de la dieta. Sin embargo, aquellas estrategias de mitigación dirigidas a reducir la excreción de nitrógeno urinario podrían resultar en niveles elevados de emisión de  $\text{CH}_4$  (Dijkstra *et al.*, 2011). El equilibrio entre la excreción de N y la producción de  $\text{CH}_4$  entérico debe comprenderse a escala animal para permitir, a futuro, realizar recomendaciones a los productores de posibles estrategias de alimentación que reduzcan simultáneamente el riesgo potencial de contaminación de N y emisión de  $\text{CH}_4$  del ganado lechero, mientras se mantienen los niveles deseados de producción y composición de leche.

## **2.2. SITUACION DEL SECTOR LACTEO**

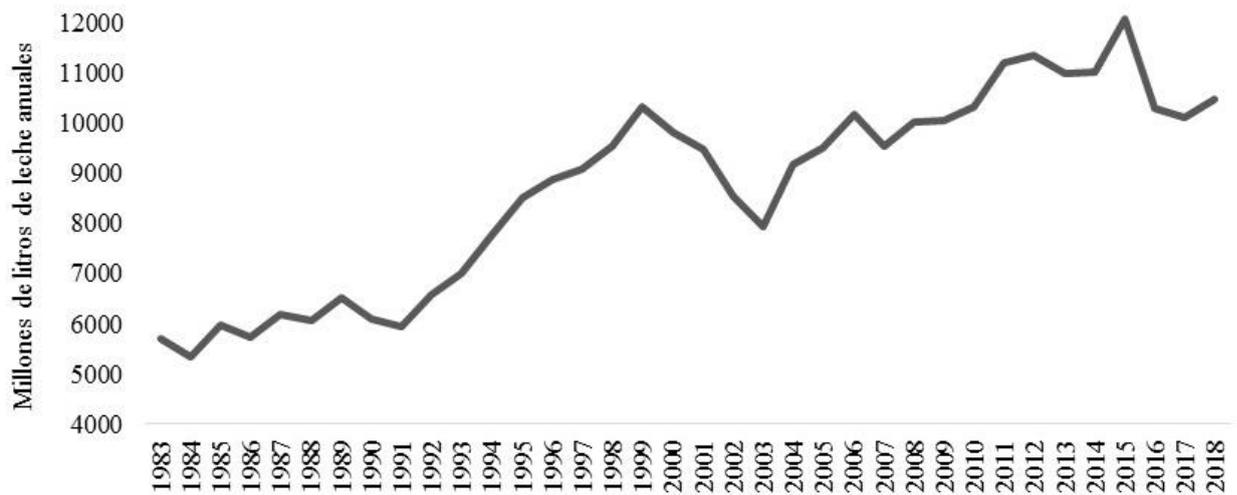
La leche es uno de los productos agrícolas de mayor producción y de mayor valor en el mundo. La creciente demanda mundial de productos lácteos y el impulso constante para mejorar la eficiencia y la rentabilidad, han dado como resultado una rápida consolidación y expansión de la industria láctea (Van Amburgh *et al.*, 2008). En base a los recursos naturales y terrestres existentes actualmente (FAO, 2011), se prevé que la producción de leche aumentará 178 millones de

toneladas para 2026, lo que implica un crecimiento del 22% (OCDE-FAO, 2017). Este crecimiento se verá impulsado por aumentos en el número de cabezas, que se estima en un 11% (79 millones de cabezas) seguido por el aumento de la productividad por vaca (FAO, 2018), en un contexto de reducción en el número de establecimientos. En la Figura 2.1 se puede observar la tendencia hacia la concentración de la producción en menor número de tambos a nivel mundial (OCLA, 2019), en donde la tasa anual de disminución de tambos en los países de América y Oceanía fue menor a la observada en los países europeos.



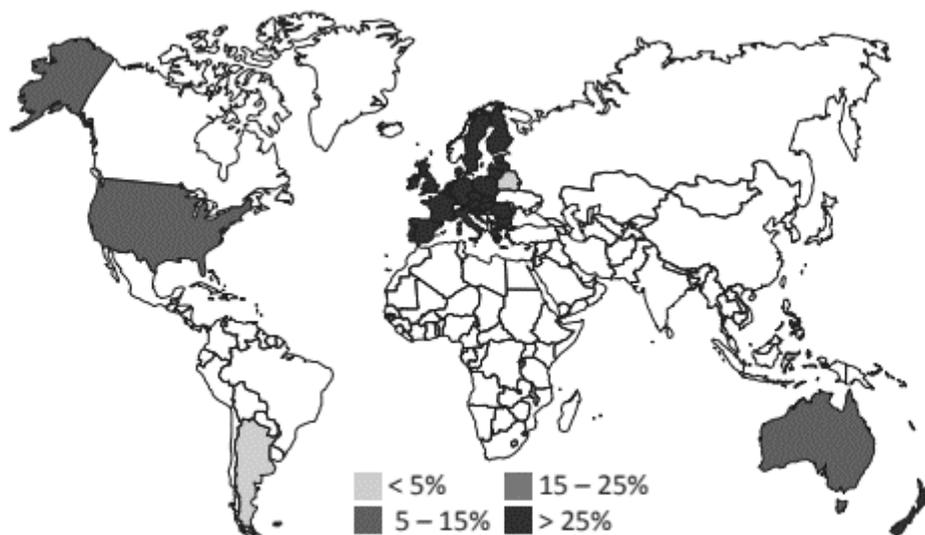
**Figura 2.1:** Tasa anual de disminución de unidades productivas en Argentina, comparado con otros países lecheros (2002 -2019) (Fuente: OCLA, 2019).

Desde inicios de la década del 90, el sector lechero argentino evolucionó de manera significativa, constituyéndose en uno de los complejos agroalimentarios más importantes y dinámicos del país, responsable del desarrollo económico y social de numerosas economías regionales. Así mismo, si bien desde inicios de la década del 90 hasta la actualidad se constata un crecimiento acumulativo del 80% (equivalente a una tasa anual alrededor del 3,5%), las variaciones ocurridas durante ese mismo periodo, resultan ser llamativas (Figura 2.2).



**Figura 2.2:** Evolución nacional de la producción de leche en Argentina (Fuente: SAGPyA, 2018).

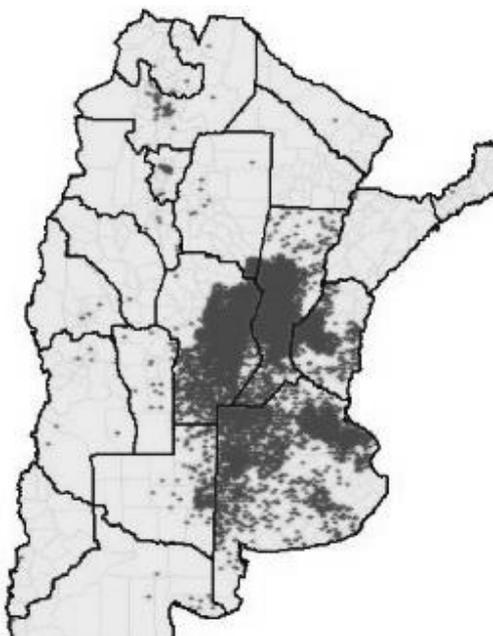
En los últimos 25 años, Argentina ha evolucionado desde una lechería de mercado interno a una creciente inserción internacional con una alta diversificación del destino de sus exportaciones. Si bien no se encuentra entre los 10 países que más producen en el mundo, se ubica entre los principales exportadores de leche (Figura 2.3), con Brasil (34,8%), Argelia (19,1%), China (8,8%), Rusia (7,2%) y Chile (6,3%) como principales destinos (OCLA, 2018). Esto es importante para un país como Argentina, que puede destinar a la exportación entre el 20 y el 25% de su producción sin afectar el consumo doméstico (Sánchez *et al.*, 2012).



**Figura 2.3:** Mapa de países exportadores claves de productos lácteos (Fuente: FIL-IDF, 2018).

A nivel nacional, la lechería realiza aportes importantes a la sociedad desde el punto de vista de la seguridad alimentaria, con consumos de lácteos superiores a los requerimientos mínimos indicados por la FAO. Por lo tanto, permite que la actividad económica tenga un destacado posicionamiento a nivel nacional y sea valorada como herramienta para el desarrollo territorial.

Las principales “cuencas lecheras”, regiones dentro de las provincias en las cuales existe una mayor densidad de tambos, se localizan en la región pampeana que son (Figura 2.4): en la provincia de Buenos Aires (Mar y Sierras, Oeste, Sur, Abasto Sur, Abasto Norte); en Santa Fe (Norte, Sur, Central); en Córdoba (Sur, Villa María, Noreste); en La Pampa (Centro- Norte, Sur); y en Entre Ríos (Entre Ríos). Existen además otras zonas productoras de importancia económica a nivel regional, debido a que se ubican cerca de importantes centros urbanos a los cuales proveen de leche fresca. La cuenca lechera santafesina, tanto por su volumen de producción como por la importancia que tradicionalmente tuvo la actividad en el desarrollo de algunas comunas, constituye la región productora más importante de América Latina.



**Figura 2.4:** Distribución de tambos en Argentina (Fuente: SAGPyA, 2018).

Argentina no es ajena a la tendencia global de reducción en el número de establecimientos lecheros. En los últimos años, la competencia por la tierra debido a la agricultura, el nivel de complejidad de la actividad, la incertidumbre de continuidad en el sector, las condiciones climáticas adversas, así como de disponibilidad y rotación de la mano de obra, condujeron a una reducción de la cantidad de tambos (tasa de cierre) y al aumento de la concentración de la

producción en menor cantidad de unidades productivas, limitados en mantener un crecimiento genuino. Esta situación ha llevado a replantear el modelo de producción de leche en donde el pastoreo de las vacas en ordeño era una de sus características principales. Desde 1988 a la fecha, se observó una tendencia de reducción del número de tambos (66% menos de unidades productivas), en el número de vacas (1,1% de tasa anual de disminución de cantidad de vacas), aumento del tamaño del rodeo y de la producción por vaca (Taverna *et al.*, 2004). Esta situación se vió más agravada en los últimos años, donde el porcentaje de reducción de tambos fue de 5,3% y la reducción en el número de cabezas fue de 7,3% para el año 2018 comparado con el 2017 (OCLA, 2019).

La reducción en el número de establecimientos y en el número de vacas no redundó en una caída en la producción y puede ser explicado por el aprovechamiento de economías de escala y por un aumento de la eficiencia media por tambo y por vaca (Sánchez *et al.*, 2012). Desde el ciclo 2003/2004 al 2010/2011, Centeno (2013) constata, en la cuenca tradicional del área central pampeana, un proceso de concentración de la producción en menos unidades (-65%) pero de mayor tamaño (+268% en vacas por tambo y +548% en litros diarios por tambo). Dicho proceso de intensificación explica el mantenimiento del volumen anual producido (+90%) aunque acompañado de la desaparición de alrededor de 19.000 tambos. Menos tambos, más vacas por tambo, menos alfalfa en pastoreo y más concentrado en la dieta de las vacas, son hoy una constante que se repite en todas las cuencas lecheras del país (Centeno, 2013). En este sentido se verificó un proceso de segmentación de la producción primaria en dos grupos: uno de gran eficiencia, con fuertes inversiones de capital, y otro sector de menor eficiencia, más trabajo intensivo y con menor aprovechamiento de economías de escala, que fue el que mayores problemas económico financieros enfrentó y donde se produjo la mayor desaparición de tambos (Gutman *et al.*, 2003). Esta reducción tiene consecuencias sociales, ya que provoca el cierre de cada tambo en producción, que involucra 15 puestos de trabajo directos y 6 indirectos (Taverna *et al.*, 2012), afectando fuertemente el desarrollo regional. Las estadísticas más confiables indican que en el año 1988 Argentina contabilizaba 30.131 unidades productivas, mientras que en el 2012 este valor descendió a 12.003, estimándose en 10.722 en el año 2018 con proyecciones firmes de continuidad en la tasa de cierre de tambos (OCLA, 2018).

Además de la problemática en la reducción del número de tambos y las consecuencias sobre el trabajo que ello trae aparejado, se suma el problema del impacto ambiental. Las consecuencias ambientales de la ganadería lechera son una preocupación pública que se encuentra en aumento

(OCDE, 2018), y recibe cada vez más prioridad en las agendas políticas, sociales y económicas de los diferentes países (Capper *et al.*, 2009). Los sistemas productivos de mayor escala y más intensivos han llevado a una creciente preocupación sobre el exceso de nutrientes y el bienestar animal (Van Amburgh *et al.*, 2008). En un contexto mundial de necesidad de lograr al mismo tiempo seguridad alimentaria y protección ambiental, la producción animal sustentable cobra protagonismo, demandando a la ciencia y la tecnología un conocimiento más profundo para evaluar el impacto ambiental que provocan los diversos modelos agropecuarios al modificar el manejo de los recursos en la búsqueda de una mayor eficiencia productiva.

### **2.3. EL IMPACTO AMBIENTAL DE LOS SISTEMAS LECHEROS**

El impacto ambiental de la producción ganadera ha recibido mayor atención en los últimos años. En ganadería, la mayoría de los problemas ambientales están relacionados al manejo de la alimentación de los animales y de las excretas y, en consecuencia, al manejo de los nutrientes y la nutrición animal. Un importante desafío al que se enfrenta el sector lechero a nivel mundial es el desarrollo de sistemas productivos que puedan mantener o aumentar la producción y la rentabilidad, reduciendo al mismo tiempo los impactos ambientales, incluidos aquellos impactos sobre el agua y el clima (Clark *et al.*, 2007; Beukes *et al.*, 2017; Beukes *et al.*, 2019). Esta situación generó que las políticas ambientales más relevantes para la producción lechera en los últimos años se hayan centrado en la contaminación del agua con  $\text{NO}_3^-$  y la volatilización de  $\text{NH}_3$ , y más recientemente en la biodiversidad y los impactos climáticos de las emisiones de GEI (Steinfeld *et al.*, 2006; Beukes *et al.*, 2019). Los GEI son gases que se encuentran presentes en la atmósfera terrestre y que dan lugar al fenómeno denominado efecto invernadero (Reyes y Iju, 2002 citado por Lemos, 2015). Los sistemas ganaderos son considerados una de las fuentes principales de emisiones de GEI y contribuyen con el cambio climático de manera directa o indirecta, debido a las emisiones de  $\text{CO}_2$ ,  $\text{CH}_4$  y  $\text{N}_2\text{O}$  (Faverin *et al.*, 2015), a través del rumen (metano entérico), el manejo de excretas y el cambio en el uso de la tierra (Lemos, 2015). Además, los modelos de producción de leche se orientan a sistemas cada vez más intensivos, con elevados aportes de concentrados ricos en N, además de otros nutrientes con importante impacto ambiental (Herrero *et al.*, 2006).

Una consecuencia común de buscar aumentar la producción animal es incrementar el N entregado en la dieta a los animales. La utilización de N por los animales es extremadamente variable y puede fluctuar entre el 5% al 45% del N de consumido. Para el caso específico de la

producción de leche, del 20% al 35% del N consumido puede ser secretado como proteína en leche (Powell *et al.*, 2016). La proporción restante, que no es retenida como producto animal, será excretada al ambiente a través de las heces y la orina (Castillo *et al.*, 2000; Powell *et al.*, 2010; Cheng *et al.*, 2011). En algunos casos, la cantidad de N excretado llega a representar el 70-80% del N consumido (Castillo *et al.*, 2000; Burgos *et al.*, 2007). Cuando esto ocurre, se incrementa también las emisiones de NH<sub>3</sub> (Dijkstra *et al.*, 2013a), junto con las emisiones de N<sub>2</sub>O (Ryan *et al.*, 2011) y la lixiviación de nitratos (Ledgard *et al.*, 1999). Diversos trabajos han demostrado que las emisiones al ambiente vía excreción en heces, o emisiones al aire (NH<sub>3</sub> y N<sub>2</sub>O) y lixiviación de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> al agua subterránea, se incrementan cuando el N entregado en la dieta excede los requerimientos animales (Ledgard *et al.*, 1999; Castillo *et al.*, 2000; Ryan *et al.*, 2011; Dijkstra *et al.*, 2013a). Por otro lado, el efecto que la aplicación de estrategias que permitan una menor excreción de N, y por lo tanto una menor emisión de N<sub>2</sub>O, puedan tener sobre la emisión de CH<sub>4</sub> entérico no es claro (Dijkstra *et al.*, 2011).

En base al aumento previsto en la demanda mundial de alimentos, especialmente de productos animales, y en medio de una presión social cada vez mayor para reducir el impacto ambiental en términos de excreción de N y emisión de CH<sub>4</sub> (Powell *et al.*, 2013; Foote *et al.*, 2015), los productores deben tomar decisiones de gestión que les permita mantener o aumentar la producción de leche para mantener la rentabilidad del sistema. El manejo adecuado de la alimentación es una de estas decisiones (Garret *et al.*, 2019), surgiendo una mejora en la EUN como una potencial herramienta para mejorar la producción de leche, y excreción de N y la emisión de CH<sub>4</sub> (Gregorini *et al.*, 2016).

### **2.3.1. El impacto ambiental del nitrógeno**

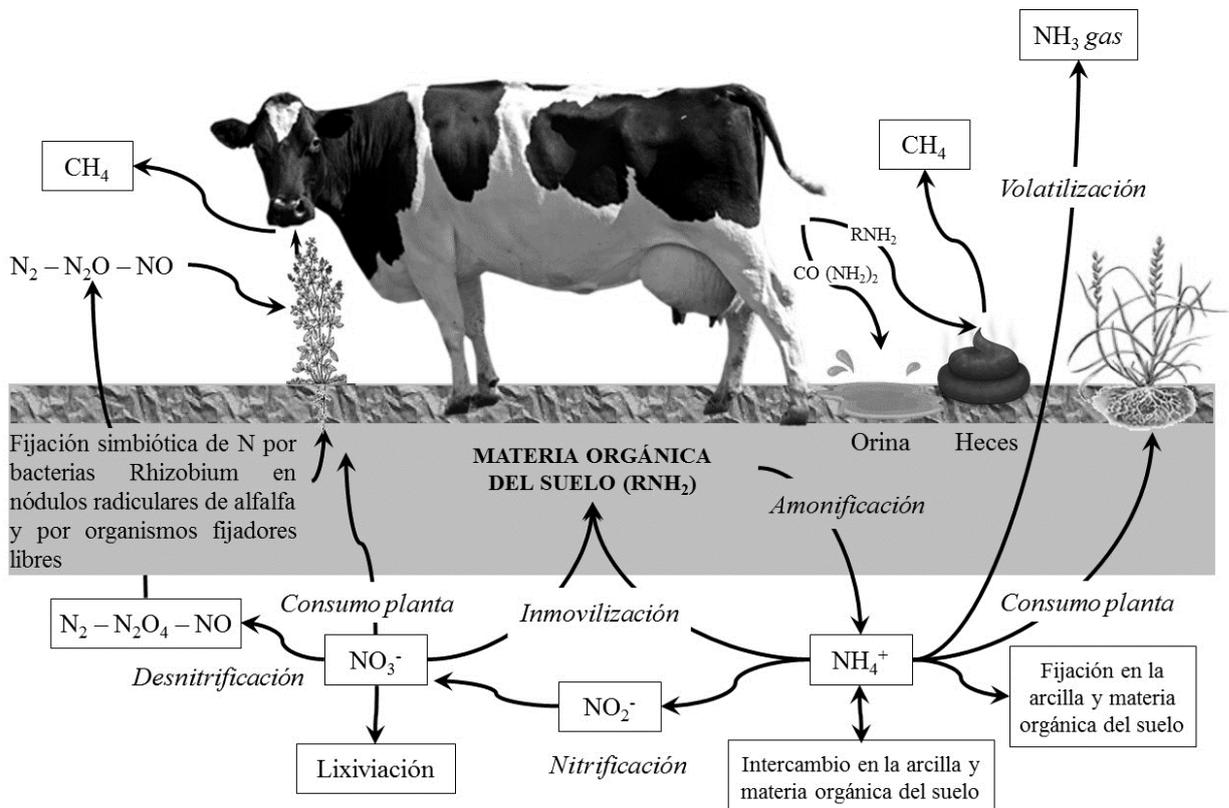
El N es un elemento esencial para la síntesis de numerosos compuestos químicos, ácidos nucleicos y proteínas. Los compuestos nitrogenados presentes en la naturaleza se dividen en dos grupos: no reactivos (N<sub>2</sub>) y reactivos (Nr). Los reactivos incluyen a todos los compuestos de N biológico, fotoquímico y radiactivamente activos en la atmósfera y la biosfera de la Tierra (e.g., amoníaco [NH<sub>3</sub>] y amonio [NH<sub>4</sub><sup>+</sup>], óxido de nitrógeno [NO<sub>x</sub>], ácido nítrico [HNO<sub>3</sub>], óxido nitroso [N<sub>2</sub>O], nitrato [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>] y compuestos orgánicos) (Galloway y Cowling, 2002). En el caso del gas nitrógeno (N<sub>2</sub>), aunque es el quinto elemento más abundante en el planeta y el mayor constituyente de la atmósfera (78% aproximadamente), el triple enlace fuerte es difícil de romper (Galloway *et al.*, 2004) y, por lo tanto, es considerado el elemento más crítico (Castillo *et al.*, 2000). El uso

extensivo y excesivo de N ha conducido a la acumulación de dicho nutriente en el ambiente (Galloway *et al.*, 1995), afectando al aire y a la calidad del agua superficial y subterránea (Tamminga, 1992).

El N es esencial para el crecimiento de las plantas (Figura 2.5). Las plantas absorben el N necesario en forma de iones de  $\text{NO}_3^-$  y amonio  $\text{NH}_4^+$  presentes en el agua del suelo. El N ingresa al ciclo a través de la descomposición de la materia orgánica del suelo (MO), mediante la aplicación de fertilizantes nitrogenados, y de las heces y la orina excretadas por los animales (Tamminga, 1992; Hendriks, 2016). Estos aportes de N pueden ser convertidos en  $\text{NH}_4^+$  mediante un proceso de amonificación, realizado por microorganismos del suelo en un entorno aeróbico. Los iones de  $\text{NH}_4^+$  tienen carga positiva y pueden ser absorbidos directamente por la planta, fijados en la superficie de las partículas coloidales del suelo o sometidos a nitrificación, donde el  $\text{NH}_4^+$  es convertido en  $\text{NO}_3^-$  por microorganismos del suelo (Tamminga, 1992). Este proceso ocurre también en un entorno aeróbico y dicho  $\text{NO}_3^-$  puede ser absorbido directamente por la planta. El  $\text{NO}_3^-$  está cargado negativamente y debido a la carga negativa de la arcilla y los coloides orgánicos, no es adsorbido por la superficie del suelo, y se pierde por escorrentía hacia aguas superficiales y lixiviación hacia aguas subterráneas (Di y Cameron, 2005; Qiu *et al.*, 2010). Si no es lixiviado, escurrido, o absorbido por la planta, el  $\text{NO}_3^-$  puede sufrir un proceso de desnitrificación por los microorganismos del suelo en condiciones anaerobias, el cual da como resultado la formación de  $\text{N}_2\text{O}$ , que es emitido a la atmósfera (Selbie *et al.*, 2015). La entrada de N por la fijación biológica ocurre por las bacterias fijadoras de N con producción de  $\text{NH}_3$  o  $\text{NH}_4^+$ , esencial para los microorganismos, porque es la única forma que tienen para obtener N directamente de la atmósfera. Algunas bacterias como las del género *Rhizobium*, fijan el N a través de procesos metabólicos. Esta simbiosis ocurre principalmente en la familia de las leguminosas. Sin embargo, existen también varias fijadoras de vida libre (e.g., *Azotobacter*) que incorporan N al suelo.

En el caso de las vacas lecheras, el N se elimina como N orgánico (40-50% del N total, principalmente en las heces) o urea (50-60% del N total, principalmente en la orina). Aunque el N orgánico es relativamente estable, la urea se convierte fácilmente en  $\text{NH}_3$ , que puede volatilizarse durante el almacenamiento y la distribución de excretas. El  $\text{NH}_3$  en la atmósfera puede generar daños mediante la deposición por lluvia ácida (Misselbrook *et al.*, 2002). Al mismo tiempo, si el N de las excretas depositadas en el suelo no es absorbido por las plantas, puede contribuir a la contaminación por  $\text{NO}_3^-$  del agua subterránea por lixiviación y a las emisiones a la atmósfera de  $\text{N}_2\text{O}$ . Las emisiones de  $\text{NH}_3$  y  $\text{N}_2\text{O}$  son especialmente preocupantes debido a sus efectos adversos

sobre la salud humana y el ambiente. El excedente de N en los parches de orina puede dar como resultado la acumulación de N mineral en el perfil del suelo (Haynes y Williams, 1993), el cual estará disponible para los microorganismos del suelo y se someterá a la nitrificación. Debido a que el  $\text{NO}_3^-$  es poco retenido por la superficie del suelo, cuando ocurre un exceso de precipitación y el agua baja por el perfil del suelo, el  $\text{NO}_3^-$  se moverá hacia abajo con el agua (Di y Cameron, 2005; Ledgard *et al.*, 2009). En algunas regiones, la principal fuente de  $\text{NO}_3^-$  en las aguas subterráneas es la orina de los animales (Haynes y Williams, 1993) concentrada en áreas de pastoreo o alimentación (Hendriks, 2016).



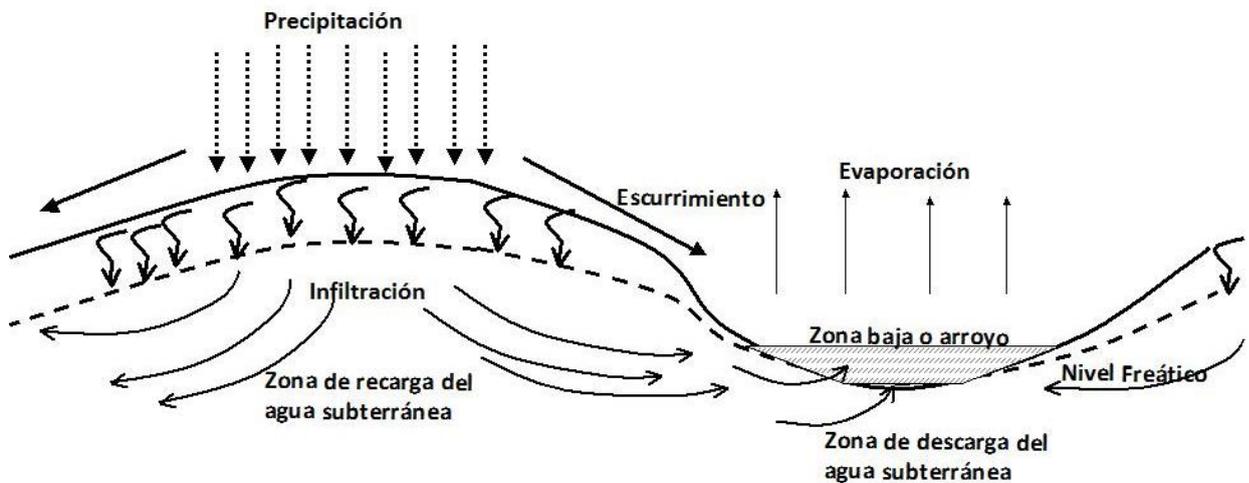
**Figura 2.5:** Transformaciones de nitrógeno en sistemas lecheros (Fuente: Adaptado de Hendricks, 2016).

**Referencias:** R: molécula orgánica compleja,  $\text{N}_2$ , nitrógeno gaseoso,  $\text{N}_2\text{O}$ , óxido nitroso,  $\text{NO}$ , óxido nítrico,  $\text{NH}_3$ , amoníaco,  $\text{NH}_4^+$ , ion de amonio,  $\text{NO}_2^-$ , nitrito y  $\text{NO}_3^-$  nitrato.

El concepto de contaminación del agua involucra a aquellos procesos que deterioran su calidad física, química y microbiológica. La calidad del agua de bebida es un factor fundamental para la salud de los animales y el nivel productivo alcanzado en los sistemas ganaderos. Muchos de los contaminantes que alteran la calidad del agua son los mismos que en el caso del suelo: N y fósforo, P (Morse, 1995; Herrero y Thiel 2002, Pacheco *et al.*, 2007; Ballantine y Davies-Colley, 2014), metales pesados (Brumm 2002, citado en Herrero y Gil, 2008), microorganismos patógenos

(Nicholson *et al.*, 2005), y hormonas o drogas de uso veterinario (Jjemba 2003; Herrero y Gil, 2008).

Los contaminantes presentes en las excretas pueden ingresar a los cuerpos de agua por diferentes vías (Figura 2.6). Por un lado, llegan a las aguas superficiales (lagos, lagunas y humedales o ríos) por escurrimiento desde corrales y terrenos con aplicación o acumulación de estiércol, por desborde de lagunas de efluentes y/o por deposición atmosférica (Galindo *et al.*, 2004; Burkholder *et al.*, 2007). Por el otro lado, llegan desde el suelo a las aguas subterráneas o acuíferos por infiltración y lixiviación (Herrero y Gil, 2008).



**Figura 2.6:** Esquema de funcionamiento hidrogeológico en llanuras. (Fuente: Herrero y Tieri, 2014).

El  $\text{NO}_3^-$  es el contaminante más común en el agua subterránea, debido a su alta solubilidad y, por lo tanto, a su facilidad de transporte por el agua a través del suelo. Por lo general, la concentración natural de  $\text{NO}_3^-$  en las aguas superficiales y subterráneas es baja (1 a 5 ppm). Sin embargo, en Argentina se han detectado excesos ( $> 150$  ppm), en aguas subterráneas cercanas a las lagunas de efluentes de tambos (Herrero *et al.*, 2000, Herrero *et al.*, 2002; Nosetti *et al.*, 2002; Vankeirsbilck *et al.*, 2016), cuando el valor guía que se sugiere en Argentina para consumo humano es de 45 ppm (CAA, 2007). Si bien, las concentraciones elevadas de  $\text{NO}_3^-$  representan un problema para la salud humana, también lo son para los rumiantes. El bovino es una especie capaz de adaptarse al consumo de diferentes tipos de agua. Sin embargo, las alteraciones en la calidad producidas por una excesiva concentración de sales o elementos químicos, producen disminución en la producción e impacto en la salud del ganado, con las consecuentes pérdidas económicas para el productor (Panigatti *et al.*, 2010; Herrero y Tieri, 2014). Un estudio de Herrero *et al.* (2008) realizado en 409 tambos de las principales cuencas lecheras de la Región Pampeana, mostró que

los valores medios de  $\text{NO}_3^-$  superaban los 45 ppm, y que entre el 26 al 66% de las muestras de agua tomadas de las perforaciones de las instalaciones de los tambos no resultaron aptas para el consumo humano. Esta situación se agrava para el caso de la lechería, donde la limpieza de la máquina de ordeño con agua contaminada puede afectar la calidad de leche obtenida (Iramain *et al.*, 2005; Herrero y Gil, 2008). Según el trabajo realizado en tambos de Santa Fe por Panigatti *et al.* (2010), los  $\text{NO}_3^-$  alcanzaron, en algunos pozos de monitoreo, concentraciones superiores a 50 ppm aguas arriba y 300 ppm aguas abajo de los predios. Por lo tanto, está demostrado el impacto ambiental de determinados manejos en establecimientos agropecuarios.

Como ya se comentó previamente, un uso excesivo de N, además de contaminar el agua, puede afectar a la calidad del aire. Una de las mayores contribuciones a la contaminación atmosférica proviene del N derivado del ganado y especialmente de las vacas lecheras (Kebreab *et al.*, 2001). La producción lechera causa pérdidas de N en las heces y la orina que contribuyen a la contaminación ambiental, ya sea como  $\text{NH}_3$ ,  $\text{N}_2\text{O}$  y óxidos de N en el aire (Tamminga, 1992; Castillo *et al.*, 2000). El  $\text{N}_2\text{O}$  se produce naturalmente en los suelos durante los procesos microbiológicos de nitrificación y desnitrificación (Saggar *et al.*, 2004), especialmente después de la aplicación de fertilizantes nitrogenados y antes que el N sea utilizado por el sistema planta-animal (De Klein *et al.*, 2008) o en los parches de orina (Pinares-Patiño *et al.*, 2009; Faverin *et al.*, 2019). La reducción de las emisiones de  $\text{N}_2\text{O}$  por kg de leche puede lograrse a través de mejoras en la salud animal y en el manejo de los establecimientos, el manejo del estiércol (Oenema *et al.*, 2009; Ussiri y Lal, 2013; Dijkstra *et al.*, 2013a; FAO, 2018) y del uso eficiente de los alimentos, en donde la estrategia más importante es la reducción de la ingesta de N (Kebreab *et al.*, 2001). Según Amon *et al.* (2006) aproximadamente el 82% de las emisiones de  $\text{N}_2\text{O}$  en los sistemas lecheros se deben al almacenamiento de estiércol, y el 18% restante cuando se realiza la aplicación de las excretas como fertilizante. Por lo tanto, las emisiones directas provenientes de animales en pastoreo son comparativamente menores (Monteny *et al.*, 2001; Higgs, 2009).

Las emisiones de  $\text{NH}_3$  son de particular importancia debido a su efecto adverso sobre el ambiente y la salud humana. Las vacas lecheras son una de las mayores fuentes de emisiones de  $\text{NH}_3$  debido a la alta concentración de N en orina (Pinder *et al.*, 2004; Powell *et al.*, 2007). El  $\text{NH}_3$  se produce principalmente por volatilización del N de la urea contenida en la orina y, en menor medida, a partir del N de las heces. Aproximadamente del 40 al 50% del N eliminado en excretas se encuentra en forma de urea, y existe un fuerte vínculo entre la concentración urinaria de urea y las emisiones de  $\text{NH}_3$  (Tamminga, 1992; Smits *et al.*, 1995; Elzing y Monteny, 1997; Monteny y

Erismán, 1998; Monteny *et al.*, 2002; Burgos *et al.*, 2007).

### En síntesis

Los aportes de N de los fertilizantes, el N fijado biológicamente, los residuos de vegetales en descomposición y las excretas animales sustentan la agricultura productiva. Sin embargo, los sistemas agrícolas son limitados en su capacidad para incorporar el N a los productos, y las pérdidas ambientales de N pueden convertirse en preocupaciones locales, regionales y globales (Powell *et al.*, 2013). Los efectos combinados de un aumento en el costo de la proteína de la dieta y la legislación introducida en varios países sobre el almacenamiento y la aplicación de estiércol y purines han resultado en un renovado interés por reducir los niveles de proteína en las dietas de vacas lecheras (Sinclair *et al.*, 2014). Las mejoras en el manejo del N son importantes debido a su contribución a la contaminación del agua subterránea (Dou *et al.*, 1998) y la emisión de NH<sub>3</sub> y N<sub>2</sub>O a la atmósfera (Fenn *et al.*, 2003; Higgs, 2009). Si bien se sabe que, generalmente, al aumentar el contenido de N en la dieta se incrementan las pérdidas de N al ambiente, es necesario conocer el efecto que la reducción de un contaminante puede tener con respecto a otros contaminantes. El efecto que la reducción del contenido de proteína en la dieta podría tener sobre la emisión de CH<sub>4</sub> ha sido muy poco estudiado (Dijkstra *et al.*, 2011).

## 2.4. DIGESTIÓN PROTEICA Y METABOLISMO DEL NITRÓGENO EN VACAS LECHERAS

La vaca lechera tiene la capacidad de convertir alimentos no aptos para el consumo humano (e.g., forrajes, subproductos) en un producto alimenticio de alta calidad, como es la leche (Wilkinson, 2011). Sin embargo, los costos de alimentación representan el 45 a 60 por ciento del costo total de producción de leche y en términos de la eficiencia total de nutrientes, solamente el 20 al 30% del N consumido se convierte en producto, mientras que el 70 al 80% restante se libera al ambiente por medio de las excretas (DairyCo, 2013). Por lo tanto, la determinación adecuada de los requerimientos proteicos por parte de los animales es fundamental para lograr maximizar la producción y minimizar la excreción de N. Como ya se ha mencionado, el metabolismo del N en el rumen ha sido identificado como el factor principal que determina la EUN por los rumiantes (Tamminga, 1992), y si bien suministros de alto contenido de proteínas generan aumento en el rendimiento de la proteína en leche, al mismo tiempo generan una disminución de la eficiencia en

el uso de la proteína (Colmenero y Broderick, 2006a; Haque *et al.*, 2012; Fanchone *et al.*, 2014). Por lo tanto, el manejo de la nutrición es una herramienta clave para reducir la contaminación ambiental (Misselbrook *et al.*, 2013).

Los rumiantes tienen un sistema único de metabolismo y digestión de proteínas que ha evolucionado para permitir la subsistencia en condiciones nutricionales relativamente pobres. Al considerar las demandas de nutrientes de un rumiante, es importante tener en cuenta que el alimento consumido no solo proporcionará nutrientes al animal, sino también a los microorganismos presentes en el tracto digestivo. La proteína de la dieta tiene cinco rutas principales de metabolismo, las cuales incluyen la degradación microbiana en el rumen, la absorción en el intestino delgado, la deposición en el tejido, la secreción en la leche y el catabolismo y excreción de proteínas en exceso en la orina y las heces (McDonald *et al.*, 2011).

Los suplementos proteicos, y alimentos con alto contenido de proteína, son el ingrediente más caro en las raciones de vacas lecheras (Dijkstra *et al.*, 2018). La mayor parte del N de los alimentos forma parte de las proteínas, que tienen que ser digeridas para su posterior absorción en el intestino delgado como AA libres y pequeños péptidos, que es asimilado en productos como leche y carne (Bussink y Oenema, 1998). Las proteínas son compuestos orgánicos complejos de alto peso molecular y la calidad de las mismas tiene relación con la cantidad y el perfil de AA esenciales. Entre los más de 200 AA presentes en compuestos biológicos, 20 son los que se encuentran con mayor frecuencia como constituyentes de las proteínas, y aproximadamente la mitad de ellos – según especie animal y estado fisiológico – son esenciales (Mc Donald *et al.*, 2014).

Una parte significativa de la PB y los carbohidratos (CHOs) de la dieta, son degradados por las bacterias del rumen (McDonald *et al.*, 2011; Patton *et al.*, 2014; Räisänen, 2016). La extensión de la degradación ruminal, dependerá, entre otros factores, de las características de la proteína, como por ejemplo la relación entre las fracciones degradables; potencialmente degradables e indegradable y sus respectivas tasas de degradación (ej., PDR y PNDR (Bach *et al.*, 2005; McDonald *et al.*, 2011). Además, la disponibilidad de E a nivel ruminal y la tasa de pasaje/tiempo de retención del alimento en el rumen afectan la extensión de la digestión proteica. Los factores químicos, como la presencia de enlaces dentro y entre las cadenas de proteínas (estructura terciaria y cuaternaria), afectan la degradabilidad de la proteína (Romagnolo *et al.*, 1994; Bach *et al.*, 2005). También se ve afectada por el pH ruminal, ya que establece el tipo de bacteria que predominará en el rumen. Sin embargo, la degradación de la proteína se reduce en el extremo inferior de este espectro (Bach *et al.*, 2005). La degradación de la proteína también depende de la

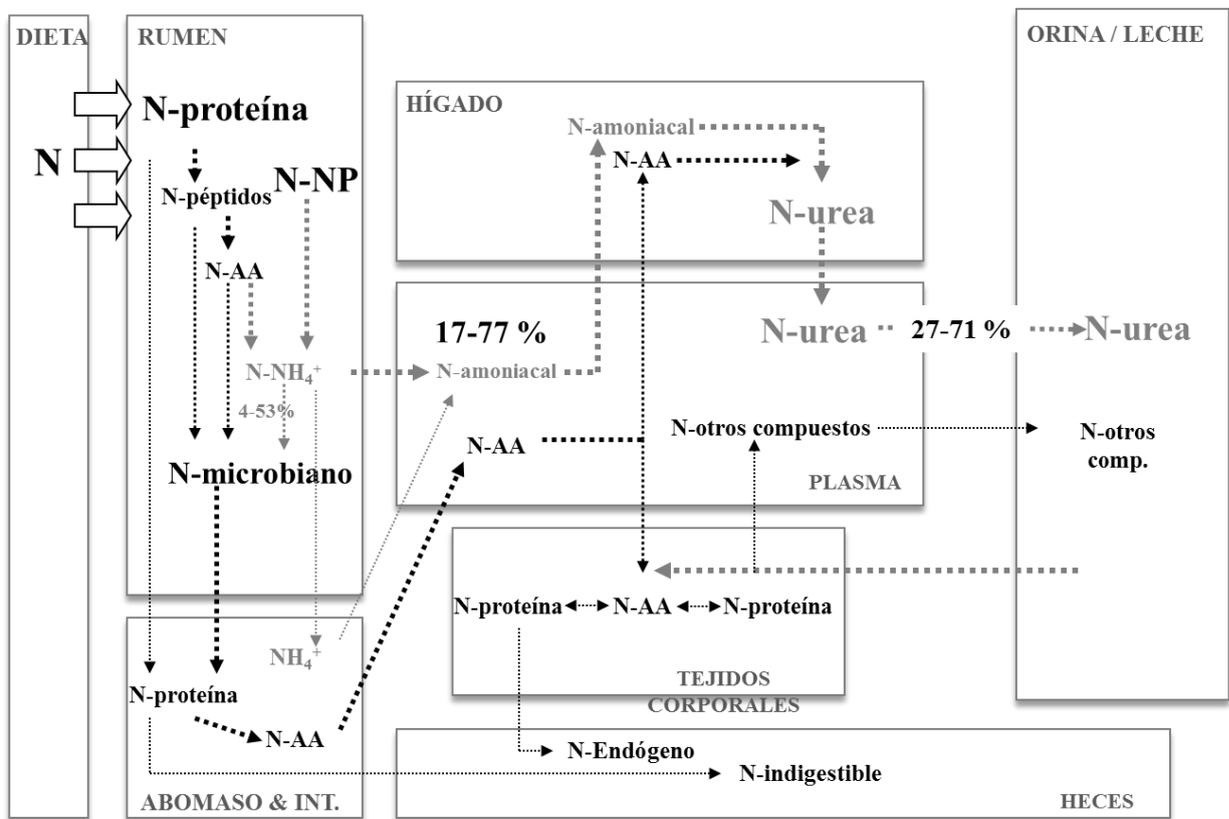
velocidad de la tasa de pasaje a través del rumen (Tamminga, 1979; Hall y Huntington, 2008), la cual depende de las características físicas del alimento y el consumo voluntario del animal (Cronje, 2000). A medida que disminuye el tamaño de partícula disminuye, el nivel de consumo de materia seca (CMS), aumenta producto de una mayor tasa de pasaje y, como resultado, la degradación de la proteína en el rumen disminuye por un menor tiempo de retención (Tamminga, 1979; Hendricks, 2016).

El contenido de MS de la dieta también afecta al CMS de las vacas lecheras. La cantidad de MS ingerida está ligada positiva y significativamente al % de MS de la planta. A igual estado de desarrollo, la ingestibilidad aumenta con el % de MS (Comerón y Tieri, 2018). Sin embargo, existe una relación negativa entre el CMS y las dietas de alto contenido de humedad (NRC, 2001). En vacas lecheras, Comeron (1991) señala que el valor crítico por debajo del cual se afecta el consumo es del 18%, y Verité y Journet (1970) demostraron una relación lineal e inversa entre el contenido de humedad del forraje y el CMS para valores de 13 a 22% de MS, estimando que, por cada unidad porcentual por debajo del rango máximo de 22%, el consumo cae a razón de 0,34 kg MS/día. Este efecto no se observa en forrajes con contenidos más altos de MS, y según Holter y Urban (1992) el CMS no disminuye cuando la MS se encuentra entre el 30 al 50%.

El proceso de degradación proteica en el rumen involucra una variedad de microorganismos y enzimas, que actúan de una manera en gran parte sinérgica (Morrison y Mackie, 1996). Las proteínas son degradadas a péptidos, AA y  $\text{NH}_3$  (Bussink y Oenema, 1998). Los microorganismos utilizan los AA y el  $\text{NH}_3$  para sintetizar sus propias proteínas y otros compuestos nitrogenados. Sin embargo, generalmente sólo una pequeña proporción del  $\text{NH}_3$  disponible es fijado, debido al limitado suministro de E al rumen (Sniffen y Robinson, 1987; Ørskov, 1992; Bussink y Oenema, 1998). Por lo tanto, si la E no es limitante, aumentar el N de la dieta, no tendrá ningún efecto adicional sobre la síntesis de PMo y puede reducir la eficiencia microbiana (Pisulewski *et al.*, 1981). El  $\text{NH}_3$  que no es utilizado por los microorganismos del rumen se absorbe a través de la pared del rumen, y de resto del tracto digestivo, y es transportado por el sistema porta al hígado, donde es convertido cuantitativamente a urea (Leng y Nolan, 1984; Tamminga, 1996; Lapierre y Lobley, 2001; Bach *et al.*, 2005; Marini *et al.*, 2006; Reynolds y Kristensen, 2008).

El hígado de los rumiantes juega un papel central en la integración del metabolismo del N en todo el cuerpo. La urea se considera a menudo un producto de desecho de la degradación proteica y puede excretarse en la orina, secretarse en la leche (Alio *et al.*, 2000), o recuperarse en el riñón y reciclarse al tracto digestivo por transferencia desde la sangre hacia el lumen del tracto o

mediante la saliva (Leng y Nolan, 1984; Marini *et al.*, 2006; Reynolds y Kristensen, 2008; Calsamiglia *et al.*, 2010; McDonald *et al.*, 2011). El N ureico reciclado de regreso al rumen se degrada a  $\text{NH}_3$  por acción de la ureasa microbiana (Bonhomme, 1990), y se puede usar para PMo o nuevamente puede absorberse como  $\text{NH}_3$  en la sangre a través del sistema porta (McDonald *et al.*, 2011). Estas transacciones se ilustran en la Figura 2.7 donde el N de la dieta puede seguirse a través del proceso de digestión hasta sus diversos productos finales, incluido el N microbiano, la proteína no degradada y el N endógeno, y el  $\text{NH}_3$  que sale del rumen (Higgs, 2009). Sin embargo, el  $\text{NH}_3$  es tóxico en altas concentraciones, y debe eliminarse (Bartley *et al.*, 1976; Nocek y Russell, 1988).



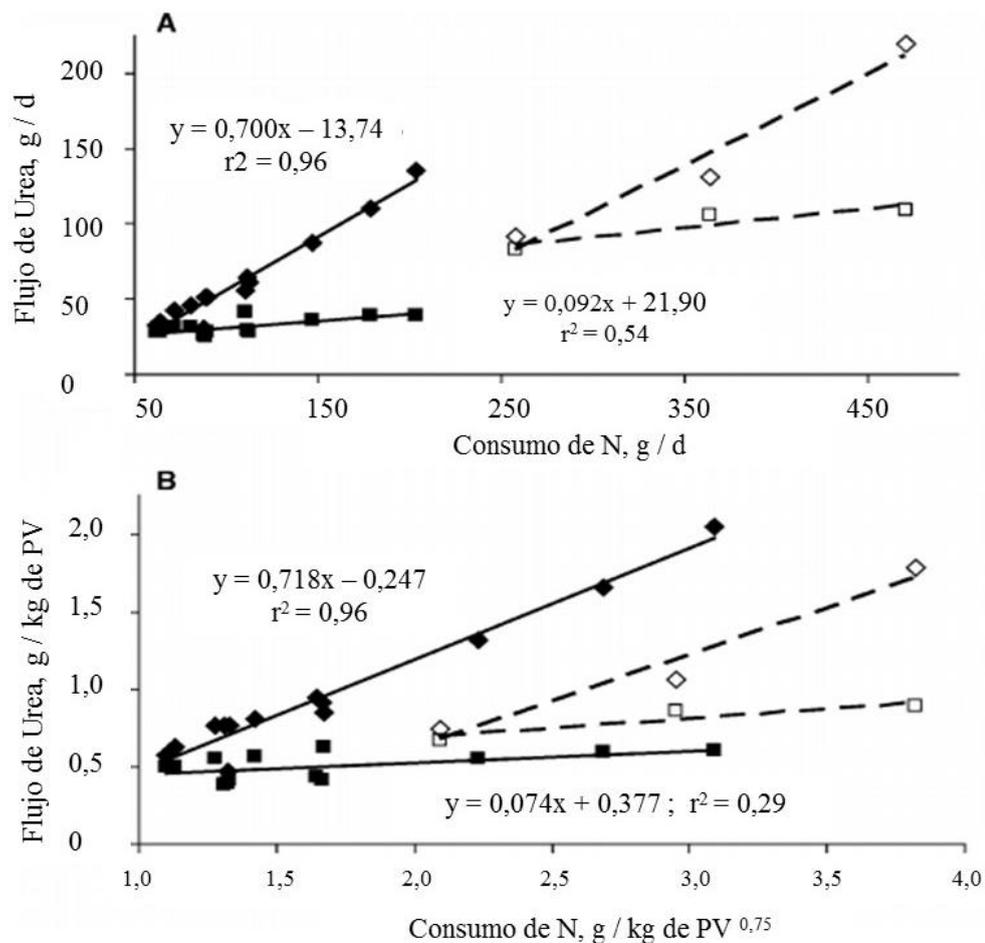
**Figura 2.7:** Esquema del metabolismo del N en vacas lecheras (Fuente: adaptado de Sarraseca *et al.*, 1998, Huntington *et al.*, 1989, Ruiz *et al.* 2002, Marini *et al.*, 2004, Wickersham *et al.*, 2008).

La producción de urea, la excreción y el reciclaje están influenciados por una serie de factores, que incluyen la composición de la dieta (e.g., nivel de PB), el consumo, el ambiente ruminal y el estado fisiológico del animal (Harmeyer y Martens, 1980; Huntington, 1986; Lapierre y Lobley, 2001; Ruiz *et al.*, 2002). En animales en lactancia, la leche es una ruta de excreción adicional de urea. La urea reciclada al trato digestivo constituye una fuente de N, en forma de  $\text{NH}_3$ , para la síntesis de proteína microbiana. Según el consumo de N, la disponibilidad de E a nivel ruminal, y el balance entre proteína y E en la dieta, entre 17 y 77% del N en forma de urea sintetizado en

hígado puede ser reciclado al tracto digestivo y convertido a  $\text{NH}_3$  nuevamente, y ser una fuente de N para la síntesis de PMo. Mientras que entre 27-71% del N en forma de urea puede ser excretado como tal en orina y leche (Figura 2.7).

Por lo tanto, en situaciones donde el suministro de PB es bajo, se realizan cambios fisiológicos en la función renal que limitan el descenso en la concentración de urea en sangre y ayudan a mantener el suministro de urea al rumen (Tebot *et al.*, 2002). A medida que el contenido de N en la dieta aumenta por encima de los niveles requeridos, la proporción de urea reciclada al rumen disminuye y la de urea excretada en orina aumenta. Como muestra Reynolds y Kristensen (2008) en la Figura 2.8, el aumento del consumo de N dio lugar a aumentos lineales en la producción diaria de urea. Sin embargo, el efecto sobre la tasa de entrada en la urea intestinal fue pequeño (Marini y Van Amburgh, 2003). En consecuencia, esto tiene un efecto negativo sobre la transferencia de urea al rumen y la incorporación de N ureico a PMo (Kennedy y Milligan, 1978; Recktenwald *et al.*, 2014). Los elevados niveles de consumo de N aportan un menor reciclaje de urea (Ulyatt, 1997) y contribuyen a una baja EUN (aproximadamente 25%) (Calsamiglia *et al.*, 2010), con niveles altamente variables de N en la dieta (75- 80%) perdidos en la orina (Whitehead, 1995; Ulyatt, 1997; Castillo *et al.*, 2000; Kebreab *et al.*, 2001), ya que la mayoría del exceso de proteína no utilizada para el crecimiento o la producción, se excreta, independientemente de si se absorbe como AA o simplemente como  $\text{NH}_3$  (Broderick, 2005).

Varios autores han demostrado que un aumento en el consumo de N da como resultado un aumento lineal moderado de la excreción de N en heces (NH) y N en leche combinado con un aumento lineal mucho más pronunciado (Kebreab *et al.*, 2010) o exponencial (Castillo *et al.*, 2000; Kebreab *et al.*, 2001) en la excreción de N en orina (NO<sub>r</sub>). El NH generalmente es constante y se puede dividir en dos grupos. Por un lado, en N endógeno que consiste en N microbiano, células desprendidas del tracto digestivo, y secreciones enzimáticas no digeridas, y por el otro en N de la dieta que no fue digerido, el cual consiste principalmente en N ligado a los componentes de la pared celular (Mason y Frederiksen, 1979; Powell *et al.*, 2009; Bosshard *et al.*, 2011; Powell *et al.*, 2017). La fracción endógena puede ser relativamente alta debido al volumen de MS que pasa por el tracto digestivo y la cantidad de fibra en la dieta (Ouellet *et al.*, 2002). Las pérdidas metabólicas, que en gran parte están constituidas por bacterias y componentes de bacterias sintetizadas en el intestino grueso, células queratinizadas, residuos de enzimas digestivas y otros compuestos, también pueden ser importantes, especialmente si la fermentación intestinal es alta (Dewhurst y Thomas, 1992).



**Figura 2.8:** Producción total de urea diaria (diamantes) y tasa de ingreso de urea al intestino (cuadrados) en relación con el nitrógeno consumido en g/día (A) o el consumo de N por kilogramo de PV<sup>0,75</sup> (B) en ganado en crecimiento (símbolos sólidos) y en vacas en lactancia (símbolos abiertos) (Adaptado de Reynolds y Kristensen, 2008).

La orina contiene una variedad de constituyentes nitrogenados, pero la forma dominante de N es la urea (Tabla 2.1.). La concentración de NOr puede variar entre 3,0 y 20,5 g/L (Wheadon *et al.*, 2014) y la excreción de N en forma de urea (NUOr) entre 63 y 208 g/día, y puede representar hasta el 90% del N total en orina (Colmenero y Broderick, 2006a; Broderick *et al.*, 2008; Dijkstra *et al.*, 2013b).

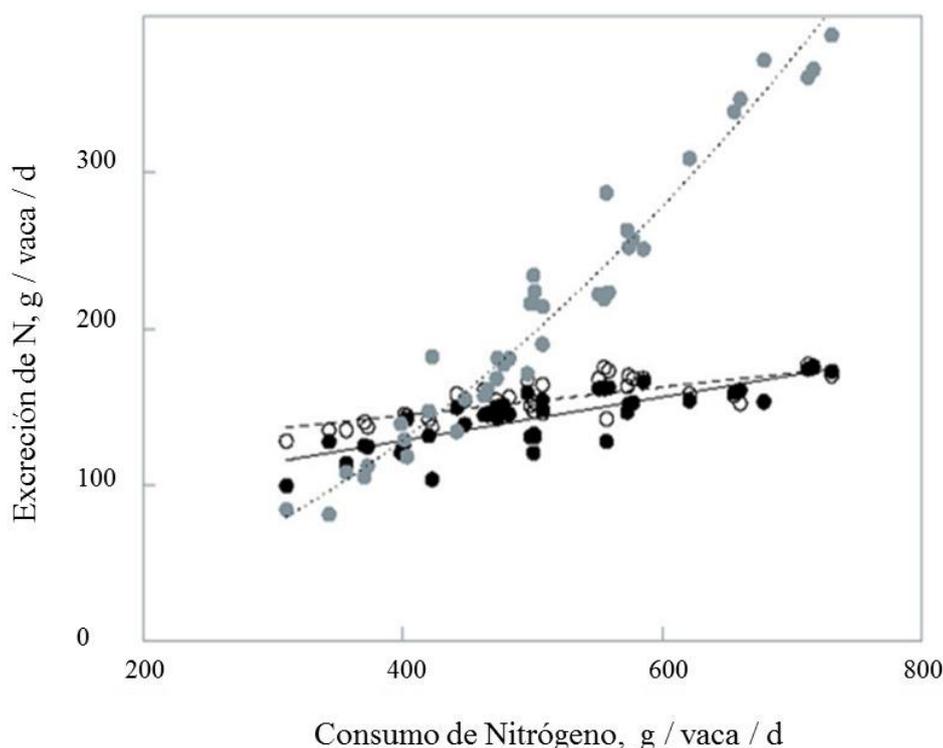
De acuerdo a la información de la tabla, es evidente que el componente que ofrece la mayor oportunidad para reducir la excreción de N es por medio de la reducción del N excretado en orina (Colmenero y Broderick, 2006a; Huhtanen *et al.*, 2008). En los estudios evaluados por Dijkstra *et al.* (2013c), la pendiente de la relación lineal entre el consumo de N y el NH varió entre 0,20 y 0,39. El mayor aumento del N eliminado por orina en comparación con la eliminación de NH al aumentar el consumo de N, fue evidente en todos los estudios.

**Tabla 2.1:** Consumo, excreción y concentraciones de N en plasma y leche

	N en la dieta, g N / 100 g alimento				
	2,16	2,40	2,64	2,86	3,10
Consumo de N, g / d	485	531	605	641	711
N en orina, g / d	113	140	180	213	257
N en heces, g / d	196	176	196	197	210
Urea en orina, g / d	63	91	128	174	208
N ureico en sangre, mg / dL	11	13	17	21	24
N ureico en leche (NUL), mg/ dL	8	9	11	13	15

Fuente: Colomero y Broderick, 2006

La Figura 2.9 representa los datos de una simulación realizada por Dijkstra *et al.* (2018) en donde se reproducen un patrón similar. La proporción de N-NH<sub>3</sub> en orina es el componente más variable en la orina (50 – 90% del N total en orina) y está relacionada con el consumo de N (Dijkstra *et al.*, 2013c). Según Marini y Van Amburgh (2003), el N-NH<sub>3</sub> en orina aumentó de 23 a 96% cuando la PB de la dieta aumentó de 9 a 21% del CMS.

**Figura 2.9:** Relación entre la ingesta total de nitrógeno, N en leche y excreción de N fecal y urinario (Fuente: Dijkstra *et al.*, 2018).

**Referencias:** Relación simulada entre el consumo total de nitrógeno (N) (g/día) y la excreción de N (g/día) en leche (•), heces (◦), y en orina (◐) para 40 estrategias nutricionales.

Por último, el volumen de orina producido es un determinante principal de la concentración de NOr, tanto en situaciones de restricción de agua como de aumento en la ingesta de agua (Spek *et al.*, 2013). El conocimiento de la excreción urinaria es necesario para la determinación de diversas variables contempladas en la nutrición de rumiantes (Posada *et al.*, 2012). La creatinina urinaria se ha usado anteriormente para estimar el volumen de orina y la excreción de los derivados de purinas (DP) (Valadares *et al.*, 1999; Arriaga Sasieta, 2010; Tebbe y Weiss, 2018). La creatinina es un metabolito que cumple con los requisitos para ser considerada como un marcador interno ya que se produce a una tasa constante a partir de la fosfocreatina y es distribuida a través del agua corporal, excretándose a una tasa constante con una baja variabilidad durante el día (Ørskov y MacLeod, 1982). La composición de la dieta tiene un efecto relativamente menor sobre la excreción de creatinina (Tas y Susenbeth, 2007). En vacas lecheras, la tasa de excreción promedio diario en orina utilizada por unidad de peso vivo (PV) es de 29 mg de creatinina / kg PV (Valadares *et al.*, 1999; Silva *et al.*, 2001; Tebbe y Weiss, 2018) y no sería afectada por el tipo de dieta (Silva *et al.*, 2001; Leal *et al.*, 2007; Chizzotti *et al.*, 2008), la raza (Rennó *et al.*, 2008), ni por el nivel de producción de leche (Chizzotti *et al.*, 2008), o el consumo de N (Gonda y Lindberg, 1994).

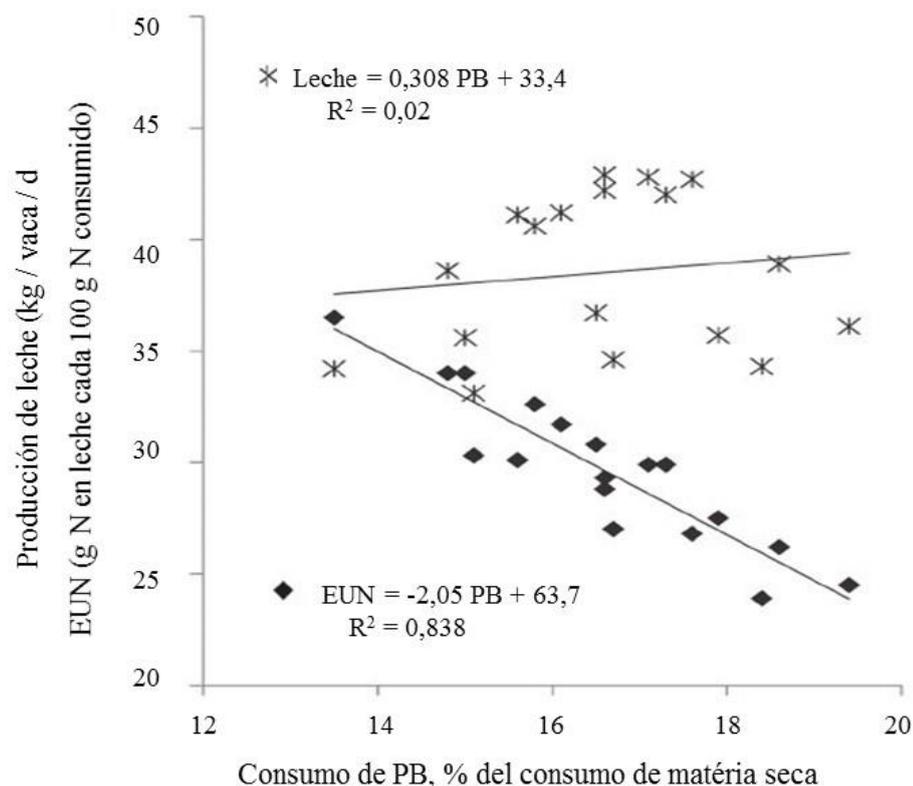
#### **En síntesis**

La comprensión de las interrelaciones que existen con la regulación de N es necesaria para facilitar el desarrollo de estrategias nutricionales que mejoren la utilización de N y reduzcan su excreción al ambiente (Higgs, 2009). La cantidad total de N excretado puede disminuirse significativamente mediante la reducción del contenido de PB en la dieta (e.g., Kebreab *et al.*, 2002; Powell y Rotz, 2015; Dijkstra *et al.*, 2018). Esto permite lograr al mismo tiempo una mejora en la EUN y una disminución del costo de alimentación (Hristov y Giallongo, 2014). Dietas bajas en PB pueden estimular el reciclaje de urea y proporcionar PDR adicional a los microorganismos del rumen cuando el suministro dietético de PDR es bajo. Sin embargo, dietas deficientes en PM y PDR pueden resultar en una disminución de la producción de leche y en el rendimiento de proteínas de la leche (Cressman *et al.*, 1980; Wu y Satter, 2000; Frank y Swensson, 2002). Por lo tanto, se requiere un nivel óptimo de PDR para reducir los niveles de PB de la dieta sin comprometer la producción de leche, reduciendo los costos de alimentación y las pérdidas de N al ambiente.

## 2.5. ESTRATEGIAS DE ALIMENTACIÓN PARA MEJORAR LA UTILIZACIÓN DEL NITRÓGENO

La gran variación en la EUN, presenta una oportunidad para manipular las dietas y lograr una mejora de dicho indicador. Sin embargo, puede ser un proceso sensible debido a las complejidades de la digestión y el metabolismo de las vacas lecheras ya descritos (Higgs, 2009).

Como ya se ha mencionado anteriormente, el manejo de las dietas puede influir en gran medida sobre la proporción de N excretada como NH y NOr y por lo tanto sobre la EUN (Figura 2.10). La concentración de PB de la dieta es el factor dietético más importante e influyente en la EUN (Castillo *et al.*, 2000; Huhtanen y Hristov, 2009; Yan *et al.*, 2010; Sinclair *et al.*, 2014). Por lo tanto, la primera estrategia para reducir la excreción de N, es eliminar la proteína de la dieta entregada en exceso (Wu *et al.*, 2001). Sin embargo, esta estrategia puede ser perjudicial para la producción de leche individual (Cantalapiedra-Hijar *et al.*, 2014).



**Figura 2.10:** Relación entre la proteína bruta (PB) de la dieta con la producción de leche y la eficiencia en el uso del nitrógeno (EUN) (Fuente: Powell y Rotz, 2015).

**Referencias:** Datos compilados de cinco ensayos de nutrición (Broderick, 2003; Colmenero y Broderick, 2006a; Colmenero y Broderick, 2006b; Broderick *et al.*, 2008; Broderick *et al.*, 2009). Cada punto de datos representa un nivel de PB en la dieta – EUN – producción de leche.

Según Castillo *et al.* (2000) las concentraciones de PB deberían reducirse a 15% de MS para mejorar la EUN y reducir el impacto ambiental. Broderick *et al.* (2009), por su parte, observaron que las dietas que contienen aproximadamente 16,5 % PB en la dieta, generalmente maximizan la producción de leche y minimizan la excreción urinaria de N. A medida que la PB en la dieta aumenta por encima de este nivel, la EUN disminuye y la excreción de N en la orina aumenta (Powell *et al.*, 2017). Tomlinson *et al.* (1996), observaron un aumento del 77% en la excreción de N cuando la concentración de PB se incrementó de 12 a 18 % con ningún efecto significativo sobre el N en leche. Otros estudios (Leonardi *et al.*, 2003; Colmenero y Broderick, 2006a), con dietas relativamente bajas en PB (i.e., 13,2 a 15,1% PB), no afectaron la producción en comparación con las dietas de 16 al 18% de PB. Estos trabajos sugieren que la producción de leche no se incrementó debido a que el rendimiento de PMo no mejoró por encima del 16,5% de PB (Colmero y Broderick, 2006a). Sin embargo, según Higgs (2009), se ha demostrado que el rendimiento de leche de las vacas de alta producción (> 30 kg/día) mejora a medida que aumenta la concentración de PB en la dieta (Grings *et al.*, 1991; Powers *et al.*, 1995; Komaragiri y Erdman, 1997; Kalscheur *et al.*, 1999; Broderick, 2003). No obstante, a partir de cierto nivel de PB comienzan a observarse rendimientos decrecientes y una meseta eventual en la que cada unidad adicional de PB suministrada se utiliza con una menor eficiencia (Metcalf *et al.*, 2008). Lee *et al.* (2011), observó que la dieta deficiente en PM (14,8% PB dietaria), disminuyó el rendimiento de leche en aproximadamente 3 kg en comparación con la dieta adecuada en PM (16,7% PB dietaria). Un efecto similar de la disminución de la PB fue informado por Cyriac *et al.* (2008). Sin embargo, en dicho caso, la disminución en el CMS con la dieta deficiente en PM fue parcialmente responsable de la disminución del rendimiento de leche (Hristov *et al.*, 2004). Grings *et al.* (1991) observaron respuestas cuando aumentaron de 13,8% a 17,5% de PB, pero no respondió al aumentar PB por encima de 17,5%. Powell y Rotz (2015), encontraron que a medida que la PB en la dieta aumenta de 14 a 18 %, la producción de leche no varía, pero la EUN en la dieta disminuye de 35,0% a 26,8% y las excreciones totales de N y NOr aumentan en 37% y 152 %, respectivamente.

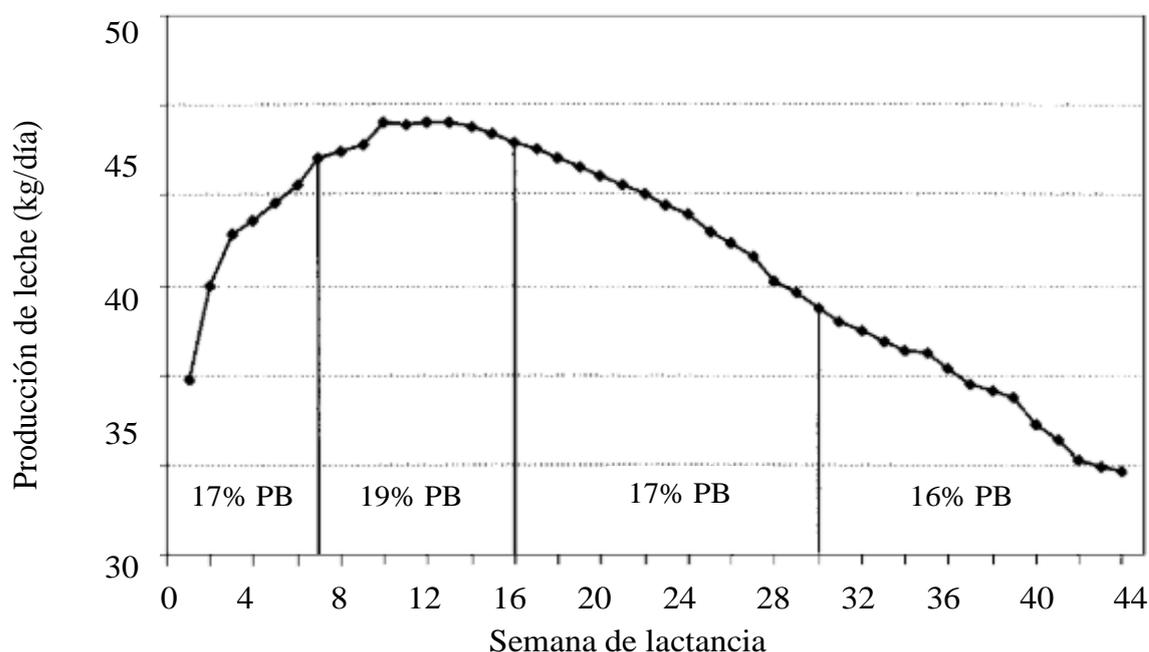
Al mismo tiempo, un aumento en el rendimiento de proteínas de la leche aumentaría la producción de N en leche y mejoraría la EUN. En una serie de trabajos se han informado rendimientos de proteína en leche similares en vacas alimentadas con 16% de PB en comparación con 18% de PB (Austin *et al.*, 1991; Akayezu *et al.*, 1997). Powers *et al.* (1995) informaron solo un ligero aumento en el rendimiento de la leche y la concentración de proteínas al aumentar la PB de 14 a 18%. En el caso de Raggio *et al.* (2004), la producción de leche aumentó linealmente al aumentar el suministro de PM (1922 g PM / d o 12,7% PB a 2517g PM / d o 16,6% PB), al igual

que la proteína en la leche. Estos datos sugieren que una concentración de PB entre el 14 y el 16% de MS es probablemente adecuada para cumplir con los requisitos en un rango de diferentes situaciones (Higgs, 2009). Sin embargo, dichos trabajos fueron realizados en vacas en mitad y final de lactancia, momento en el cual una deficiencia de PB tendrá un menor impacto sobre la producción de leche (Kalscheur *et al.*, 1999; Owens, 2014). Según el NRC (2001), en las primeras semanas de lactancia las vacas requieren mayor cantidad de PB en la dieta para sobrellevar en forma adecuada el periodo del balance energético negativo. Por lo tanto, luego del pico de lactancia, el requerimiento de PM puede ser cubierto con dietas de baja concentración de PB, maximizando el CMS. Sin embargo, son pocos los trabajos que han evaluado dichos requerimientos a lo largo de la lactancia completa. Tal es el caso de Kalscheur *et al.* (1999), quienes encontraron que, en vacas a inicio de lactancia, la PL y el contenido proteico de la misma, fue mayor en dietas con mayor contenido de PB. Sin embargo, hacia fines de la lactación, las vacas alimentadas con mayor PB en la dieta no aumentaron su producción de leche en comparación con aquellas alimentadas con menores contenidos de PB, indicando que las dietas pueden formularse con concentraciones de PB más bajas y aun así mantener una PL equivalente a las dietas con mayor concentración proteica.

Wu y Satter (2000), determinaron la respuesta de vacas de alta producción cuando eran sometidas a dietas con niveles de PB entre 14 y 19 %PB dieta a lo largo de la lactancia (308 días). En base a los resultados obtenidos, estos autores delinearon una curva de lactancia donde optimizaban la respuesta animal con diferentes niveles de PB (Figura 2.11). Dichos autores, en base a los resultados obtenidos, sugieren que una alta concentración de PB puede no ser recomendable durante las primeras 8 semanas de lactancia, para luego aumentarla por encima de los 17,5 % PB para el caso de vacas de alta producción, durante lo que resta de la lactancia.

Por último, la variación en el consumo de N en la dieta afectará particularmente a la excreción de NOr, que es muy vulnerable a las pérdidas de N al ambiente (Dijkstra *et al.*, 2013a) y una de las formas más prometedoras de disminuir las pérdidas de N en los sistemas lecheros, con efectos perjudiciales mínimos sobre el rendimiento, es mejorar la EUN (Kohn *et al.*, 1997). Wu y Satter (2000) demostraron que, al reducir el contenido proteico de la dieta, se redujo la excreción total y urinaria de N. Igualmente, Mulligan *et al.* (2004) observaron relaciones lineales positivas significativas entre el consumo de N y el N excretado en orina, heces y leche. Corea *et al.* (2017) concluyeron que la disminución de PB de 17 a 15,5 % no alteró el rendimiento de la leche, la composición de la leche, ni la eficiencia de alimentación (EfA) o la digestibilidad de los nutrientes.

Sin embargo, disminuyó el N ureico en leche (NUL), la excreción de NH y NOr y el aumento de la relación entre 0,80; 0,95 y 0,89 sobre el costo de alimentación.

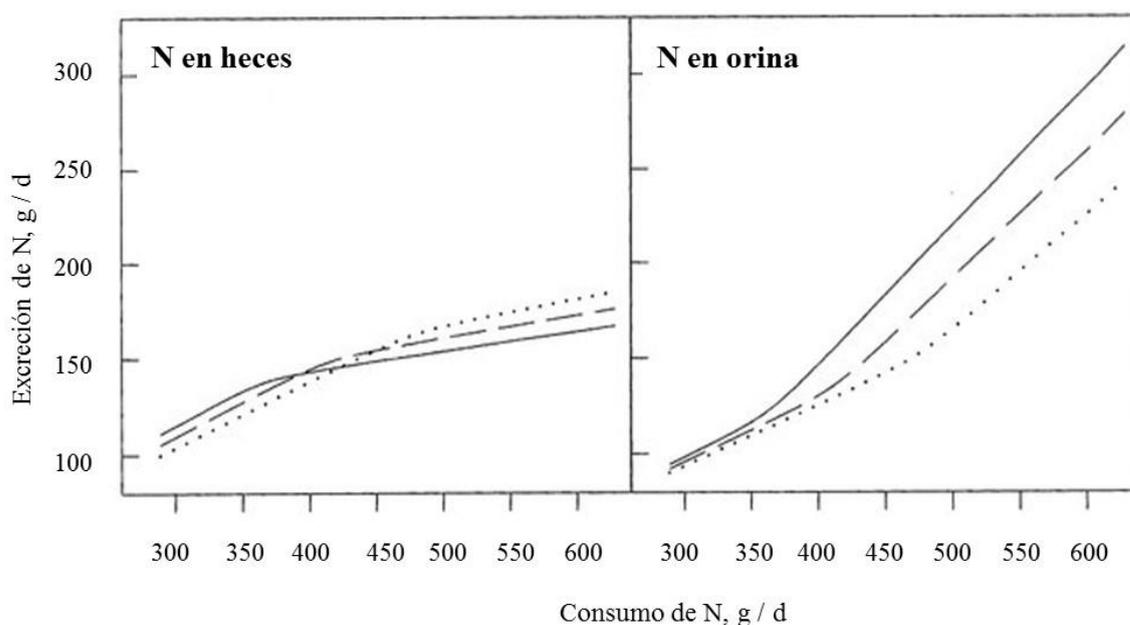


**Figura 2.11:** Recomendación de dietas con diferentes niveles de proteína bruta (PB) en distintos momentos de la lactancia (Fuente: Wu y Satter, 2000).

El mantenimiento de altos niveles de producción y rendimiento de proteína de la leche en dietas con bajo contenido en PB también se puede lograr usando diferentes niveles de degradabilidad de la proteína o mediante la utilización de AA protegidos. Muchos intentos han sido realizados para sustituir alimentos proteicos por fuentes con alta concentración de PNDR, y así lograr aumentar el flujo de PM. Sin embargo, después de revisar los informes de 15 estudios in vivo, Santos *et al.* (1998) concluyeron que el reemplazo de la harina de soja, con alta concentración de PNDR, no aumentó los flujos duodenales de N no amoniacal (NNA) total ni de AA esenciales, lisina (Lys) o metionina (Met). Con respecto a la excreción de N, Kebreab *et al.* (2002) evaluaron, mediante un modelo, dietas en donde la degradabilidad de la PB para investigar el efecto de la relación de PDR: PNDR sobre la cantidad de N excretado. La respuesta del modelo a cambios en la degradación de la PB y su efecto en la excreción de N, se investigó por medio de la variación de los parámetros de N que pasaron al pool de N microbiano y al pool de AA. Cambios en la degradación de la proteína afectaron marginalmente a la excreción de NH, pero el mayor efecto fue en la excreción de NOr (Figura 2.12). Según los mismos autores, en consumos de 400 g N/d, la excreción de N en heces fue linealmente proporcional a la cantidad de N disponible en el rumen, principalmente debido a una mejora en la síntesis de PMo. Sin embargo, a medida que en N

disponible en el rumen excede la cantidad de E disponible (por encima de los 400 a 420 g N/d), el N microbiano en el rumen comienza a ser constante independientemente de la degradabilidad de las proteínas.

Si bien la principal estrategia para reducir la excreción de N y mejorar la EUN es eliminar la proteína de la dieta entregada en exceso, otras covariables pueden influir en la partición de N, como es el suministro de E (Firkins y Reynolds, 2005). El suministro de forma sincronizada de N y E al rumen es esencial para maximizar el crecimiento microbiano y, por consiguiente, la EUN (AFRC, 1993). Los microorganismos del rumen necesitan E en forma de ATP para poder capturar el  $\text{NH}_3$  y usarlo como una fuente de N para el crecimiento (Nocek y Russell, 1988). La fermentación de CHOs es la principal fuente de ATP. Cuando el suministro energético es bajo, se ha demostrado que la adición de una fuente de CHOs rápidamente fermentescible mejora la captura, tanto del N de la dieta como del N endógeno, y aumenta el suministro de AA al intestino delgado (Lapierre y Lobley, 2001).



**Figura 2.12:** Efecto de la degradabilidad de la proteína en la excreción de N en heces y orina en vacas lecheras a inicio y mitad de lactancia (Kebreab *et al.*, 2002).

**Referencias:** El modelo asumió una disponibilidad de la proteína en el rumen de 50 (...), 60 (- -) y el 70% (-) del total de la proteína bruta consumida.

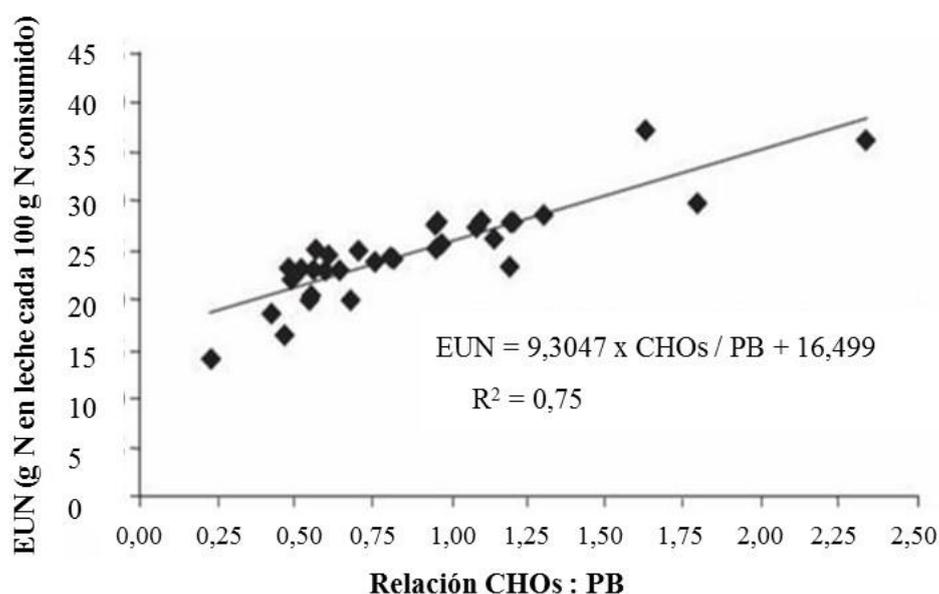
La naturaleza de la E puede afectar la degradabilidad del rumen y la tasa de fermentación ruminal (Sauvant y Van Milgen, 1995; Hristov y Jouany, 2005) e interactuar con la digestión y el metabolismo proteico (Firkins, 1996). Si la entrega de E a los microorganismos del rumen aumenta mientras que el suministro de PDR no cambia, se forma menos  $\text{NH}_3$  y se pierde como urea a través

de la orina. De manera similar, el aumento del suministro de E metabolizable (EM; punto de encuentro entre la oferta y demanda) puede reducir las pérdidas de N en los tejidos postabsortivos. Además, la síntesis de N microbiano puede depender de la naturaleza del ecosistema bacteriano, que difiere según la fuente de E (Belanche *et al.*, 2012). Broderick (2003) informó hallazgos similares cuando se incrementó la proporción de E entregada en función del nivel de PB en vacas lecheras. Sin embargo, informaron una caída en el pH ruminal con los CHOs adicionales, por lo tanto, los resultados podrían ser negativos si no se mantienen las condiciones del rumen propicias para una digestión eficiente de las fibras (Higgs, 2009).

Los resultados de la literatura sobre el efecto de la composición de CHOs de la dieta (almidón vs Fibra) en el rendimiento de proteína de leche son variables e inconsistentes (Khalili y Sairanen, 2000; Hristov y Ropp, 2003; Broderick, 2003; Niu *et al.* 2016), probablemente porque el efecto de los CHOs a menudo se confunde con la cantidad total de E consumida. Según Cantalapiedra-Hijar *et al.* (2014), la producción de N en leche sería reducida para aquellas dietas con mayor cantidad de fibra, en comparación con las dietas altas en almidón (dietas isoenergéticas). Sairanen *et al.* (2005) vieron un aumento lineal en la PMo disponible para la absorción a medida que agregaron un suplemento a base de cereal a vacas alimentadas con pastura. El contenido de proteína en la leche también aumentó y el NUL disminuyó, lo que sugiere una mejora en la EUN. La proteína se usa de manera más eficiente cuando es el primer nutriente limitante (Van de Haar y St-Pierre, 2006). Con el fin de minimizar el impacto negativo de las dietas bajas en N en el rendimiento de proteína de la leche, la EUN, se podría mejorar al reemplazar un porcentaje de fibra de la dieta por almidón a concentraciones isoenergéticas. La disminución de la concentración de PB en la dieta y el cambio en la composición de CHOs pueden ser dos estrategias complementarias para mejorar la EUN (Cantalapiedra-Hijar *et al.*, 2014). Kolver *et al.* (1998) evaluaron dicha hipótesis mediante la alimentación a vacas lecheras con una fuente de CHOs no estructurales al mismo tiempo que pastura de alta calidad y encontraron que la suplementación con CHOs de forma sincronizada disminuyó la concentración de NH<sub>3</sub> (utilizado como indicador de la síntesis de PMo) en el rumen en un 22 a 43%, de tres a cinco horas después de la alimentación con forraje fresco. Esto implica que, en estos momentos, se produjo menos catabolismo de AA y se usó N ruminal más eficientemente. Sin embargo, en general, los cambios en la dieta no afectaron la excreción de N o la utilización total de N por la vaca (Kolver *et al.*, 1998; Higgs, 2009).

Se ha sugerido la sincronización del suministro de PB y E como otro medio importante para mejorar la captura de PDR (Castillo *et al.*, 2000; Huntington y Archibeque, 2000). Esta hipótesis

significaría que los microorganismos tienen acceso a altas cantidades de E en sincronía con altas cantidades de NH<sub>3</sub>, lo que reduce el retraso en el suministro de E a medida que se fermentan los CHOs fibrosos (Taweel *et al.*, 2006). Durante la fermentación ruminal de dietas con alto contenido de almidón, el suministro de E fermentescible se sincronizará mejor con la liberación de NH<sub>3</sub>, mejorando así la captura de N microbiano (Sinclair *et al.*, 1993; DairyCo, 2013). A partir de los resultados de publicaciones que evaluaron el efecto de forraje con diferentes niveles de CHOs sobre la EUN en vacas lecheras, Keim y Anrique (2011) ponen de manifiesto que la EUN tiende a aumentar linealmente cuando la relación CHOs solubles: PB aumenta (Figura 2.13).



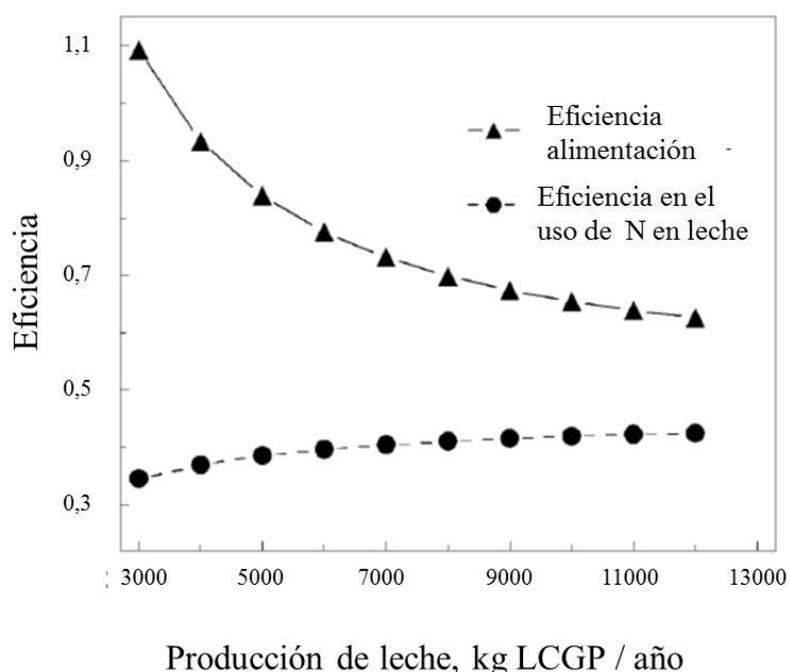
**Figura 2.13:** Relación entre el consumo de carbohidratos solubles (CHOs) y proteína bruta (PB) de la dieta y la eficiencia en el uso del nitrógeno (EUN) en vacas lecheras (Fuente: adaptado de Keim y Anrique, 2011).

Con respecto a la de proteínas de la leche, Van de Haar y St-Pierre (2006) demostraron que aumentaba de forma curvilínea al aumentar el consumo de PB en 3 niveles diferentes de consumo de E (40, 50 y 60 Mcal de EM / d). Por lo tanto, la eficiencia de convertir el N del alimento en N en leche fue del 35% cuando el consumo de N limitó la producción de leche, pero solo fue del 25% para la producción máxima de N de leche en cada nivel de consumo de E, e incluso menos cuando la PB estaba por encima de los requerimientos.

Otra estrategia inmediata para reducir la excreción de N y mejorar la EUN puede ser la mejora en la productividad animal, la cual permitiría disminuir el impacto al ambiente y a su vez tener menores costos de producción. Al producir mayor cantidad de leche por animal, los requerimientos

de proteína para mantenimiento se diluyen (Rotz, 2004). Es decir, se produce leche con una menor cantidad de N consumido y excretado.

Las mejoras en la nutrición, la genética y la aplicación de diferentes tecnologías han mejorado marcadamente la eficiencia de la producción de leche en base a forrajes (Dijkstra *et al.*, 2013b). Dichas mejoras se lograron debido al aumento del rendimiento por animal. Sin embargo, aunque la EfA mejora significativamente con los aumentos en el nivel de producción, la EUN máxima alcanzable puede no mejorar en una medida similar (Figura 2.14).



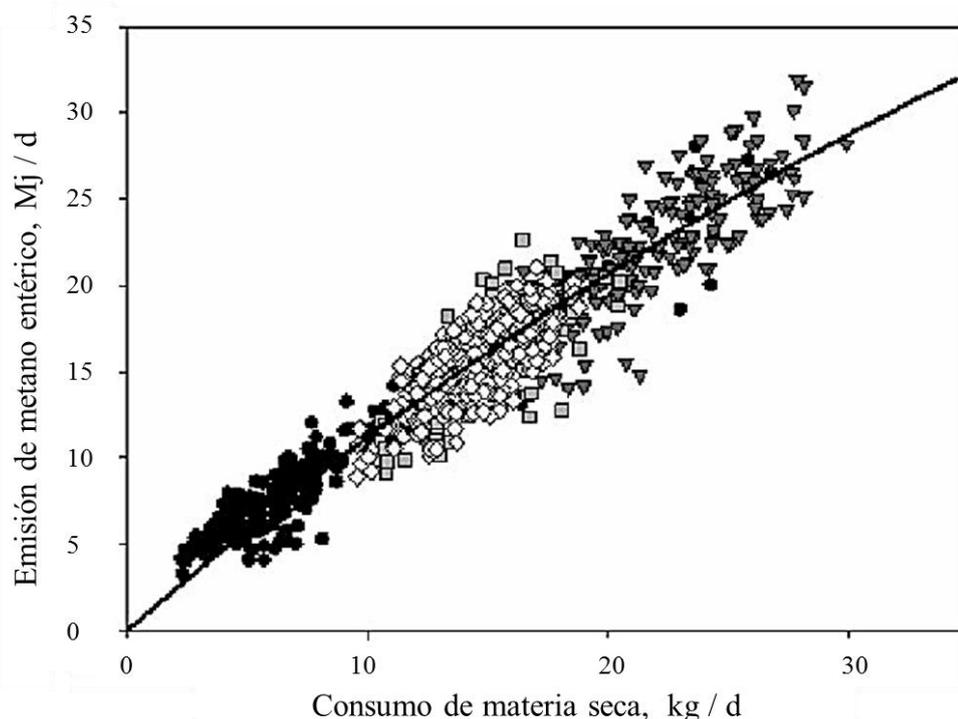
**Figura 2.14:** Relación entre el nivel de producción de leche con respecto a la eficiencia de la alimentación y la eficiencia en el uso del N en leche (Fuente: Dijkstra *et al.*, 2013b).

**Referencias:** LCGP, leche corregida en grasa y proteína. La línea discontinua indica regresión lineal.

### 2.5.1. Implicancias sobre la emisión de metano

La producción de CH<sub>4</sub> en los bovinos provoca una pérdida de 2 a 12 % de la E bruta del alimento (Johnson y Johnson, 1995) y está correlacionada con el CMS (Figura 2.15), la digestibilidad y la tasa de pasaje de la digesta (Mathison *et al.*, 1998). El CH<sub>4</sub> se genera por la fermentación ruminal del alimento y los excedentes de hidrógeno (H<sub>2</sub>) producidos, son utilizados por las bacterias metanogénicas para la reducción del CO<sub>2</sub> a CH<sub>4</sub>, el cual es emitido mediante el proceso de eructación (Beltrán-Santoyo *et al.*, 2016).

El aumento del contenido de CHO estructurales en relación con el contenido de CHO solubles se asocia con una mayor producción de CH<sub>4</sub> en el rumen (Kebreab *et al.* 2006) y una mayor digestión de la fibra detergente neutro (FDN) que resultarían en una mayor emisión de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub>. Se ha demostrado que los cambios en la composición de la FDN asociados con la madurez de la planta (Boadi y Wittenberg, 2002) y el tipo de especie vegetal (Chaves *et al.*, 2006) alteran la emisión de CH<sub>4</sub> entérico en condiciones de pastoreo. Los rumiantes alimentados con forrajes ricos en carbohidratos estructurales suelen producir más CH<sub>4</sub> que aquellos alimentados con forrajes o dietas que contengan mayores niveles de carbohidratos solubles (Sauvant y Giger-Reverdin, 2009; Archimède *et al.*, 2011). Las gramíneas tropicales (C4) tienden a ser menos digeribles que los forrajes de zonas templadas (C3) debido a su mayor contenido de FDN y mayor lignificación, y producen una mayor cantidad de CH<sub>4</sub> por unidad de ingesta (Pinares Patiño *et al.*, 2009; Archimède *et al.*, 2011). Por el contrario, las leguminosas tropicales son significativamente menos digeribles y producen menos CH<sub>4</sub> por unidad de consumo que las leguminosas de zonas templadas, debido al mayor contenido de taninos y otros metabolitos secundarios en las leguminosas tropicales afecta a la digestibilidad de la FDN y a la producción de CH<sub>4</sub> (Archimède *et al.*, 2011; Knapp *et al.*, 2014).



**Figura 2.15:** Relación entre el consumo de materia seca (kg/d) y la emisión de metano (MJ / d) en vacas lecheras (Fuente: Kebreab *et al.*, 2010).

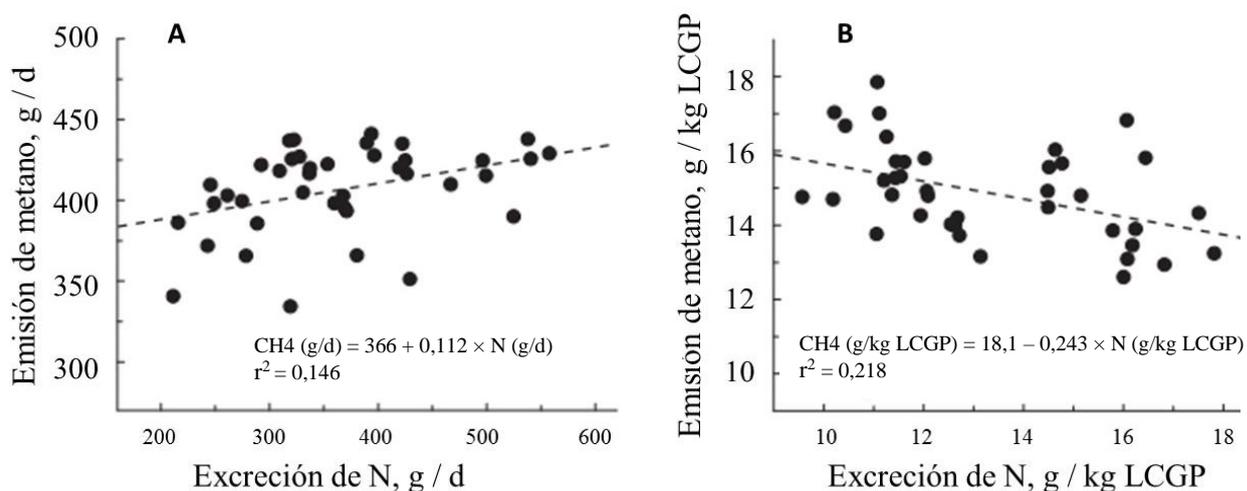
**Referencias:** Los símbolos representan diferentes ensayos.

El metano entérico ( $\text{CH}_4$ ) y el N fecal y urinario son dos contaminantes importantes por parte de las vacas lecheras. Sin embargo, las relaciones entre estos dos componentes han sido raramente estudiadas, y en la actualidad, los efectos informados del contenido de PB en la dieta sobre la emisión de  $\text{CH}_4$  han sido variables (e.g., Dijkstra *et al.*, 2011; Staerfl *et al.*, 2012; Chiavegato *et al.*, 2015; Sutter *et al.*, 2017). Si bien la reducción del contenido de PB de la dieta disminuye la excreción de N, dicho efecto es menos claro aún con respecto a la emisión de  $\text{CH}_4$  entérico (Edouard *et al.*, 2016). Se han estudiado varias estrategias de mitigación destinadas a reducir las emisiones entéricas de  $\text{CH}_4$  o las excreciones de N en vacas lecheras, aunque de forma independiente (Beauchemin *et al.*, 2008; Dijkstra *et al.*, 2011; Hristov *et al.*, 2013). Si bien la proteína no es un nutriente primario utilizado por los microorganismos del rumen para la metanogénesis, y por lo tanto su fermentación no parece estar asociada con una formación sustancial de  $\text{CH}_4$  (Sutter *et al.*, 2017), las estrategias nutricionales dirigidas a reducir la excreción de N pueden aumentar las emisiones de  $\text{CH}_4$  y viceversa (Bannink *et al.*, 2010; Ellis *et al.*, 2012).

Mediante un modelo mecanístico, Dijkstra *et al.* (2011) llevaron a cabo una simulación para analizar y abordar el problema de posibles compensaciones entre las emisiones de  $\text{CH}_4$  y la excreción de N. El objetivo de dicho estudio fue evaluar la interacción entre la PB y la E de la dieta, para reducir las emisiones de  $\text{CH}_4$  y la excreción de N simultáneamente. Para ello cuantificaron el impacto de dichas dietas sobre las emisiones de  $\text{CH}_4$  entérico y la excreción de N en vacas lecheras lactantes alimentadas con raciones totalmente mezcladas (RTM) basada en fuentes forrajeras alternativas. La reducción del contenido de forraje en la dieta resultó en una menor digestibilidad del FDN, mayor rendimiento de leche corregida en E (LCE), menores emisiones de  $\text{CH}_4$  (g / día), así como una menor excreción de NOr, independientemente del contenido de PB en la dieta. La disminución del contenido de PB en la dieta redujo la excreción de N en excretas (g / día) y aumentó la partición de N a proteína de la leche, pero no se observó ningún efecto en las emisiones de  $\text{CH}_4$ . Según Dijkstra *et al.* (2011), como los cambios en el contenido de PB exigen variaciones en otros nutrientes de la dieta, el aislamiento de los efectos de la PB, es un desafío y esto explica los resultados variables relacionados con la emisión de  $\text{CH}_4$  entérico y distintos niveles de PB.

Simulaciones realizadas por Ellis *et al.* (2012) sugirieron que la disminución de PB y su reemplazo por CHO solubles aumentarían la formación de  $\text{CH}_4$  en el rumen. En una simulación realizada por Dijkstra *et al.* (2010), la correlación entre la excreción de N y  $\text{CH}_4$  simulado fue positiva, pero pequeña ( $r^2=0,15$ ) (Figura 2.16), ya que el nivel de CMS es un determinante importante de ambas excreciones. Sin embargo, cuando se expresaron por unidad de leche

corregida por grasa y proteína (LCGP), la excreción de N y la emisión de CH<sub>4</sub> se correlacionaron negativamente ( $r^2 = 0,22$ ). Por lo tanto, la suplementación con dietas bajas en PB y ricas en almidón, como el silaje de maíz, redujo la excreción de N y CH<sub>4</sub> por kg de LCGP. En general, la fermentación del almidón en el rumen da lugar a mayores proporciones de ácido propiónico y menos ácido acético y butírico (Bannink *et al.*, 2006) asociadas con la formación reducida de CH<sub>4</sub> en el rumen. Por lo tanto, las simulaciones evaluadas mostraron que las estrategias para reducir la excreción de N por unidad de leche pueden disminuir o aumentar la emisión de CH<sub>4</sub> por unidad de leche.



**Figura 2.16:** Relación entre la excreción simulada de N y la emisión de metano entérico en vacas lecheras de lactancia media con dietas basadas en silaje de pastura (Fuente: Dijkstra *et al.*, 2010).

**Referencias:** LCGP, leche corregida en grasa y proteína. La línea discontinua indica regresión lineal.

Según Niu *et al.* (2016), las emisiones de CH<sub>4</sub> y las excreciones de N en las vacas lecheras pueden reducirse mediante la disminución del consumo de forraje y el contenido de PB en la dieta. En dicho trabajo, la disminución del contenido de PB en la dieta redujo la excreción de N (g / día) y aumentó la partición de N a la proteína de la leche, pero no se observó ningún efecto en las emisiones de CH<sub>4</sub>. Similares resultados se observan en el trabajo presentado por Kidane *et al.* (2018), en el cual la disminución gradual de la PB en la dieta de 17,5 a 13,0 % no afectó el CMS, ni la producción de leche, los rendimientos de los componentes de la leche, o la emisión diaria de CH<sub>4</sub>. Sin embargo, la disminución de la PB en la dieta aumentó la EUN y redujo la excreción de NOr, tanto en términos cuantitativos como en proporción del consumo de N. Al contrario, Dijkstra *et al.* (2011) estimaron un aumento promedio de 0,30 g de CH<sub>4</sub> por g de disminución de NOr para diversas intervenciones nutricionales con dietas a base de silaje. No obstante, con respecto a las emisiones directas e indirectas de N<sub>2</sub>O, la reducción estimada de las emisiones de N<sub>2</sub>O (en

equivalentes de CO<sub>2</sub>), resultante de la disminución de la excreción de N, fue más que compensada por un aumento en la producción de CH<sub>4</sub> entérico.

En vista de estos resultados, un desafío importante para reducir las pérdidas de N en el ganado lechero es encontrar un equilibrio nutricional óptimo sin aumentar la producción entérica de CH<sub>4</sub> (Dijkstra *et al.*, 2013b).

### **2.5.2. Implicancias sobre el balance de nitrógeno a nivel sistema.**

Una mejora en la EUN de la dieta puede traducirse en mejoras significativas en los balances de N a nivel sistema (Jonker *et al.*, 2002; Kohn *et al.*, 1997). Han sido propuestas varias estrategias relacionadas con la nutrición que pueden mejorar la utilización de N y reducir la excreción de N en vacas lecheras. Estas estrategias incluyen la reducción del nivel de fertilización con N (e.g., Peyraud y Astigarraga, 1998; Warner *et al.*, 2016), corte de pastura para mejorar su eficiencia de utilización (e.g., Brask *et al.*, 2013), utilización de alimentos bajos en PB y alto contenido de E como silaje de maíz (e.g., Van Gastelen *et al.*, 2015) y el ajuste de la composición del concentrado (Børsting *et al.*, 2003). Sin embargo, la nutrición no solo afecta la utilización de N por la vaca, sino también la composición de las excretas y, por lo tanto, su interacción con la mayor parte de los procesos por los cuales el N es convertido y perdido en los sistemas (Dijkstra *et al.*, 2018).

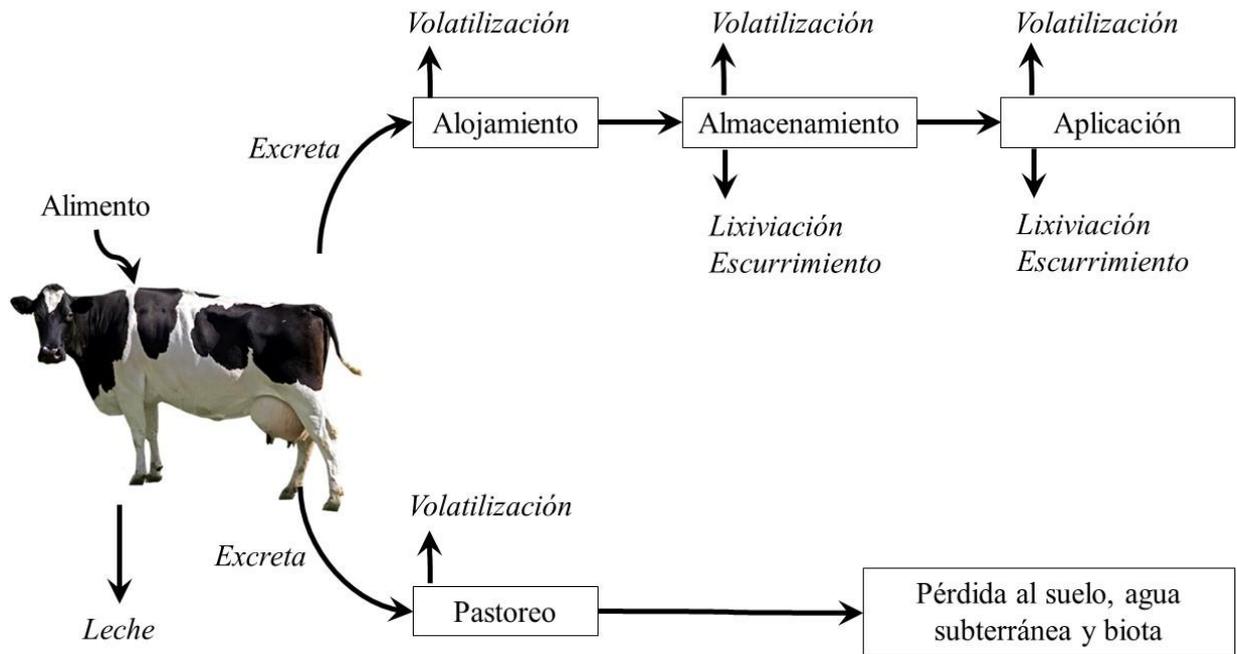
Los cambios en la composición de la dieta afectan la utilización de N de los efluentes aplicados en el campo (Sørensen *et al.*, 2003; Reijs *et al.*, 2007; Jost *et al.*, 2013). Por esta razón, la evaluación de las estrategias nutricionales debe ir más allá del nivel animal. Sin embargo, la nutrición puede afectar a todos los niveles de este sistema al reducir la cantidad total de N que sale de la vaca en forma de excretas (Higgs, 2009).

En la figura 2.17 se presenta una descripción esquemática de las vías de pérdida de N en varios puntos del sistema en la gestión de las excretas. Sin embargo, los enfoques matemáticos han estimado que, en los sistemas lecheros, aumentar la conversión de N del alimento en productos animales en un 50%, reduciría las pérdidas ambientales de N hasta un 40%. En contraste, reducir las pérdidas de otras áreas del sistema, como el almacenamiento, recolección y aplicación de excretas en un 100%, reduciría solamente las pérdidas totales de N en un 14% (Kohn *et al.*, 1997; Higgs, 2009).

Las implicaciones del sistema en su conjunto para mejorar la EUN, incluyen reducciones

en los costos de alimentación, los cuales llegan a representar hasta el 75% de los costos totales (Kebreab *et al.*, 2010) principalmente en aquellos insumos importados, reducciones en la carga de nutrientes en el predio y menor riesgo de contaminación de N para los recursos hídricos y la atmósfera (Dou *et al.*, 1998; Kohn *et al.*, 1997; Tylutki *et al.*, 2004; Higgs, 2009).

Tylutki *et al.* (2004) realizaron un estudio de cinco años en sistemas lecheros donde implementaron un programa de manejo de nutrientes, y observaron una reducción del 17% en la excreción de N, así como mejoras significativas en la producción y la rentabilidad de todas las vacas. Hallazgos similares fueron mostrados por Dou *et al.* (1998), quienes concluyeron que al implementar un programa de manejo nutricional en un rodeo en el cual originalmente no contaban con estrategias adecuada, el N en estiércol se podría reducir en un 10% y se aumentaría la producción de leche en un 20%.



**Figura 2.17:** Pérdidas de N en la gestión de excretas (Fuente: adaptado de Pinder *et al.*, 2004).

Se han construido varios indicadores comunes para evaluar y monitorear la contaminación por medio de los presupuestos de N a escala tambo (Oenema *et al.*, 2003). Por ejemplo, un indicador común es el balance o excedente de N (entrada de N - salida de N), que a menudo se informa por unidad de área (Nevens *et al.*, 2006; Dalgaard *et al.*, 2012).

### En síntesis

En espera de una era de alimentación de vacas lecheras de alto rendimiento con dietas bajas en PB, será necesario desarrollar estrategias nutricionales que optimicen la captura de N en el rumen, mejoren la digestión y absorción de N en el intestino delgado y optimicen la utilización de N (Sinclair *et al.*, 2014). Entregar dietas con un exceso de PB puede resultar en gastos de alimentación innecesarios sin retorno, por medio de la producción de leche o proteínas de la leche. Además, la mayoría del exceso de N en la dieta se excreta en la orina (Broderick, 2003). Por lo tanto, el balance de las raciones con respecto a los niveles de PB se considera una vía importante para reducir los impactos negativos del N en el ambiente para el caso de los sistemas lecheros (de Klein y Eckard, 2008; Powell *et al.*, 2008; Aguerre *et al.*, 2010). En base a una variedad de estudios que analizaron los efectos de la concentración de PB en la dieta han encontrado pocos beneficios de la alimentación a vacas lecheras con dietas que contengan más del 16% de PB. La reducción de la PB en la dieta a niveles aproximadamente el 15% de la MS lograrían reducciones significativas en el N fecal y urinario. También, equilibrar los requisitos de PB de las vacas con cantidades correctas de PNDR y PDR tiene efectos positivos, no solo en el costo de la ración y la rentabilidad, sino también en el ambiente. Además, para minimizar la excreción de N y maximizar la utilización de N a nivel animal, se debe tener un equilibrio adecuado de E combinado con el suministro de N al rumen (Dijkstra *et al.*, 1998; Dijkstra *et al.*, 2018). La alimentación con cantidades adecuadas de CHOs rápidamente fermentescible y la sincronización del suministro de E y PB, es fundamental para garantizar que la captura microbiana del N disponible en el rumen sea eficiente. Sin embargo, la evidencia sobre un gran número de estudios ha producido resultados contradictorios. Por lo tanto, los beneficios ambientales y económicos de la disminución del N consumido en la dieta deben equilibrarse con el posible efecto negativo sobre la productividad de las vacas y la rentabilidad del sistema.

## 2.6. UTILIZACION DEL NITRÓGENO UREICO EN LECHE COMO HERRAMIENTA PARA LA GESTION DEL NITRÓGENO

Para cumplir con los estándares ambientales actuales y las regulaciones de calidad del aire previstas, se requieren métodos sólidos que cuantifiquen la gestión del N de los sistemas lecheros (Thomassen y de Boer, 2005). La medición directa del NOr y NH resulta una medida poco práctica para ser aplicada en sistemas comerciales. Por esta razón, la cuantificación debe basarse en

estimaciones en lugar de datos medidos a campo.

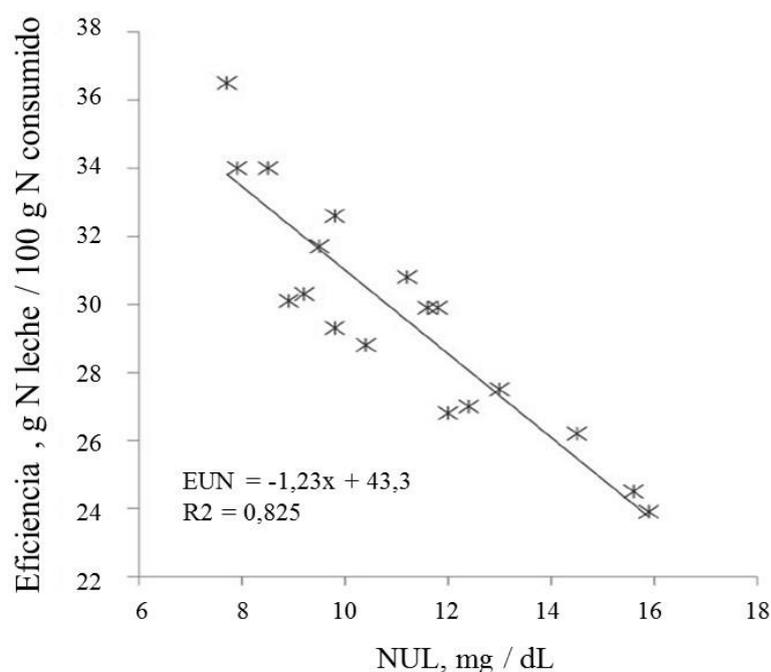
Los modelos matemáticos brindan la oportunidad de predecir el rendimiento y las emisiones de N utilizando indicadores que se pueden alcanzar fácilmente y evaluar de forma económica. Uno de estos indicadores es el NUL, más conocido internacionalmente como MUN (sigla del nombre en inglés, Milk Urea Nitrogen), ha sido ampliamente estudiada como una herramienta para predecir la EUN de la dieta en vacas lecheras y las pérdidas de N al ambiente (Kauffman y St. Pierre, 2001; Jonker *et al.*, 2002). Al ser un producto final del metabolismo de las proteínas, está claramente relacionada con la concentración de PB en la dieta (Colmenero y Broderick, 2006a; Lee *et al.*, 2011). Por lo tanto, la alimentación excesiva de proteínas puede conducir a altas concentraciones de NUL, lo que causaría un desperdicio innecesario (DePeters y Ferguson, 1992; Broderick y Clayton, 1997). Como ya mencionamos anteriormente, la proteína que la vaca no utiliza para su mantenimiento y producción, se descompone en  $\text{NH}_3$ , y es convertida en urea en el hígado, que luego puede reciclarse en el rumen o excretarse en la orina. Cuando se produce urea, esta se difunde en todos tejidos del cuerpo de la vaca y aparece en la leche (Rodríguez y Yañez, 2000). Por lo tanto, el NUL es el resultado de la difusión del contenido de urea del suero sanguíneo a través de las células secretoras de la glándula mamaria, constituyendo una fracción variable del N total de la leche y su contenido representa alrededor del 50% del NNP y alrededor del 2,5% del N total (DePeters y Ferguson, 1992).

Debido a su fácil análisis en muestras de leche, la prueba de NUL como indicador ha cobrado mayor relevancia porque supone una herramienta que evalúa la EUN y ciertos trastornos del comportamiento reproductivo de la vaca lechera. Las compilaciones de varios experimentos de nutrición en vacas lecheras mostraron un  $r^2$  de 0,825 entre la EUN (g N en leche / 100 g N consumido) y el NUL (mg /dL) (Broderick, 2003; Colmenero y Broderick, 2006a; Colmenero y Broderick, 2006b; Broderick *et al.*, 2008; Broderick *et al.*, 2009; Powell y Rotz, 2015; Hoekstra *et al.*, 2020). Esto demuestra que el NUL se puede usar para predecir el consumo de N en la dieta (Figura 2.18) y la EUN (Powell *et al.*, 2014). Por lo tanto, dicho indicador puede usarse para evaluar la nutrición proteica de los animales, predecir la excreción de NOr (Jonker *et al.*, 1998; Kauffman y St-Pierre, 2001; Nennich *et al.*, 2006; Zhai *et al.*, 2007) y también las emisiones de  $\text{NH}_3$  (Burgos *et al.*, 2007; Monteny *et al.*, 2002).

Tradicionalmente, los valores de NUL recomendados oscilaron entre 10 y 14 mg / dL (Ishler, 2017). Sin embargo, más recientemente, se han comenzado a recomendar valores de NUL que oscilen entre 8 y 12 mg / dL. Este rango de valores indica un consumo óptimo de N (Nousiainen

*et al.*, 2004; Kohn, 2007; Spek *et al.*, 2013) y permitiría una reducción de los niveles de NH<sub>3</sub> en el rumen (Ishler, 2017). Aquellos valores mayores a los 12 mg/dL suelen indicar un nivel bajo de EUN y un alto NUOr (Hutjens y Chase, 2012), ambos indeseables. Por otro lado, cuando el NUL es demasiado bajo, la producción de leche y la proteína de la leche pueden reducirse, lo que también es indeseable desde el punto de vista de la rentabilidad del sistema productivo.

La urea está presente en la leche en concentraciones muy pequeñas (aproximadamente 3-25 mg / dL), como resultado de la difusión de N ureico en sangre (NUS), más conocido como BUN (sigla del nombre en inglés, Blood Urea Nitrogen), a través de las células secretoras de la glándula mamaria. Por lo tanto, NUL está altamente correlacionado con NUS (Wheaton *et al.*, 2014; Cantalapiedra-Hijar *et al.*, 2015). Sin embargo, las concentraciones de NUS pueden ser influenciadas por el consumo de PB y de E, y por la excreción urinaria.



**Figura 2.18:** Relación entre NUL y EUN de la dieta (Fuente: Powell y Rotz, 2015).

**Referencias:** Cada punto de datos representa una media de tratamiento NUL-EUN.

Debido a que ésta se elimina del cuerpo en la orina, mediante un incremento del consumo de agua de bebida, se puede aumentar la producción urinaria, y de esta manera disminuir la concentración de NUS. De esa manera, NUS es sensible a las ingestas proteicas, energéticas y de agua, a diferencia del NUL. Por esta razón, aunque los factores no nutricionales pueden influir mucho en el NUL (Wattiaux *et al.*, 2005; Kohn *et al.*, 2004; Spek *et al.*, 2013), se ha convertido en la herramienta utilizada en algunos países para ajustar las concentraciones de PB y E en las

raciones de vacas lecheras, y así mejorar la EUN de las vacas lecheras y reducir la excreción de NUOr y las emisiones de NH<sub>3</sub> (Powell *et al.*, 2008; Burgos *et al.*, 2010; Van Duinkerken, 2011).

### **En síntesis**

La nutrición animal es una importante herramienta de manejo para reducir las pérdidas de N al ambiente. El potencial de utilizar el NUL como un predictor de la EUN y la excreción de N, es de particular interés, para mejorar estratégicamente la utilización de N y el rendimiento animal a través de técnicas sencillas y económicas, que pueden además estar directamente relacionado con el potencial de una dieta para contribuir a la excreción al ambiente y, en consecuencia, la lixiviación de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> hacia aguas subterráneas.

## **2.7. NIVELES DE PROTEINA EN LAS DIETAS EN VACAS LECHERAS Y SU EFICIENCIA EN EL USO DEL NITROGENO Y EMISION DE METANO ENTÉRICO EN TAMBOS DE ARGENTINA**

Muchos productores tienden a asegurar el suministro de PB mediante una 'sobre suplementación' para maximizar la PL individual. Sin embargo, actualmente existen productores que se orientan a evitar el suministro excesivo de N en la dieta debido a medidas políticas establecidas o en desarrollo en diferentes países, con respecto al impacto negativo del N en el ambiente. Entregar más proteína de la necesaria, generalmente aumenta los costos de alimentación, pero las pérdidas de leche debido a una cantidad de PB por debajo de la adecuada pueden ser aún más costosa. En consecuencia, los tambos tienen pocos incentivos para alimentar a las vacas con niveles menores al 18% de PB (Van de Haar y St-Pierre, 2006).

Los desafíos de los establecimientos lecheros de Argentina se basan principalmente en lograr aumentos de la productividad y la rentabilidad (Tieri *et al.*, 2017a). Sin embargo, existen evidencias de que los procesos orientados exclusivamente a maximizar la productividad y mejorar el resultado económico, generan repercusiones a nivel ambiental y de sustentabilidad del sistema en su conjunto. En busca de estos objetivos, la lechería argentina ha sufrido durante los últimos años un proceso de intensificación, enfrentando problemáticas de índole productiva, socioeconómica y ambiental, cuya intensidad es consecuencia de: brechas tecnológicas, competencia entre actividades sin complementariedad, dificultad para la gestión y del impacto ambiental.

En este contexto, uno de los desafíos de la lechería nacional, es el crecimiento sustentable. En el marco del proyecto de INTA “Sustentabilidad de los sistemas de producción de leche” se utilizó la información recopilada por encuestas a sistemas de producción de leche de la Argentina con el objetivo de evaluar los niveles de PB en las dietas utilizadas en las vacas en ordeño (VO) por los productores, la secreción de N en leche, la excreción de N (heces + orina), su relación con la EUN de la dieta, y las emisiones de CH<sub>4</sub> entérico (Tierl *et al.*, 2017b). Para ello, se utilizaron datos de 122 tambos de diferentes provincias de la región pampeana (35% Santa Fe, 35% Córdoba, 22% Buenos Aires y 8% Entre Ríos) durante el ciclo julio 2014 - junio 2015.

El formulario utilizado contenía preguntas sobre aspectos estructurales, técnicos y productivos. En base a la información recopilada, se estimó el CMS (NRC, 2001), y se calculó el consumo de N (g/d), el N excretado (NE, g/d, heces + orina) y la EUN (g N leche/g N consumido). El N excretado se determinó como la diferencia entre el N consumido y el N eliminado en la leche, bajo el supuesto de que la retención de N fue cero, y la emisión de CH<sub>4</sub> por VO (g/d) fue calculada mediante la metodología del IPCC (2006).

Las dietas con una concentración de PB del 16% o menos no son infrecuentes en las lecherías comerciales de algunos países (Hristov y Giallongo, 2014). Sin embargo, en Argentina los productores aun apuntan a niveles más elevados de PB entregada en las dietas, con la idea de lograr una mayor producción diaria de leche. En la Tabla 2.2 se puede observar una descripción general de los sistemas evaluados, en los cuales el nivel de PB promedio fue de 18,0 % de la MS ( $\pm 2,0$ ), con valores máximos de 23,7% de PB y mínimos de 13,7%). El 19% de los tambos consumió 16% de PB o menos, el 31% de los sistemas utilizó dietas con niveles de PB por encima del 16% y menor o igual al 18% de PB y la mitad utilizó más del 18% de PB (18 y 20% de PB).

Al evaluarse los niveles promedios utilizados según los sistemas de alimentación clásicos de los sistemas lecheros argentinos, aquellos sistemas con ración totalmente mezclada (RTM) tuvieron niveles de PB inferiores y con menor variación ( $17,2, \pm 1,81$  % PB), con respecto a los sistemas de ración parcialmente mezclada (RPM;  $17,9 \pm 2,00$  % PB) y a los sistemas que entregan los alimentos por separado ( $18,6 \pm 2,07$  % PB).

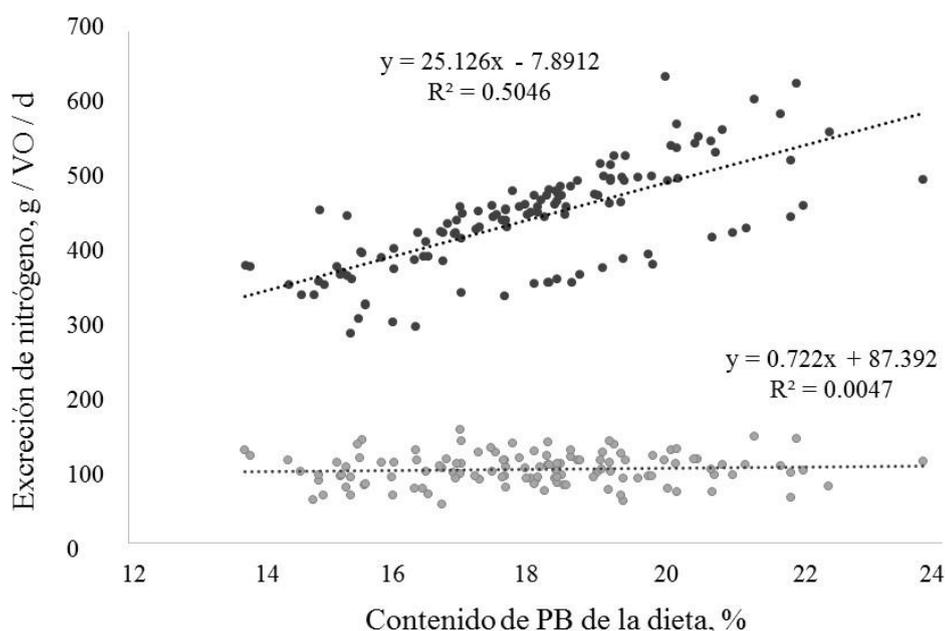
Con respecto al N secretado en leche y la excreción en heces y orina (evaluado como consumo N – N secretado en leche), en función del contenido de PB de la dieta (Figura 2.19), se puede observar que, al igual que lo descrito en el por otros autores a lo largo del presente capítulo, no se observó una respuesta en la secreción de N en leche en función de la PB de la dieta.

Contrariamente, el contenido de N excretado en heces y orina aumentaron de forma lineal ( $R^2 = 0,50$ ) a medida que el contenido de PB de las dietas evaluadas fue mayor.

**Tabla 2.2:** Caracterización de variables productivas y de emisión de metano en 122 tambos analizados (Proyecto INTA 1126043) de la Región Pampeana, Argentina.

Variables	Medía	DE	Mín.	Máx.
Superficie vaca adulta (VT), ha	183,9	122,4	28,5	740,0
Carga, VT/ ha VT	1,4	0,5	0,6	3,4
Producción, kg / VO / d	20,1	4,3	10,9	29,8
Grasa butirosa, %	3,6	0,2	2,7	4,1
Proteína en leche, %	3,2	0,1	2,3	3,6
PB de la dieta, %	18,0	2,0	13,7	23,7
EUN, %	18,6	3,6	10,4	30,4
Emisión de CH <sub>4</sub> , g / VO / d	312,6	73,9	180,0	451,0
Intensidad de emisión de CH <sub>4</sub> , g / kg Leche	15,9	4,0	9,3	26,8

**Referencias:** VO: vaca en ordeño; VT: vaca total (vaca en ordeño + vaca seca); PB: proteína bruta; EUN: eficiencia en el uso del N. DE: desvío estándar.

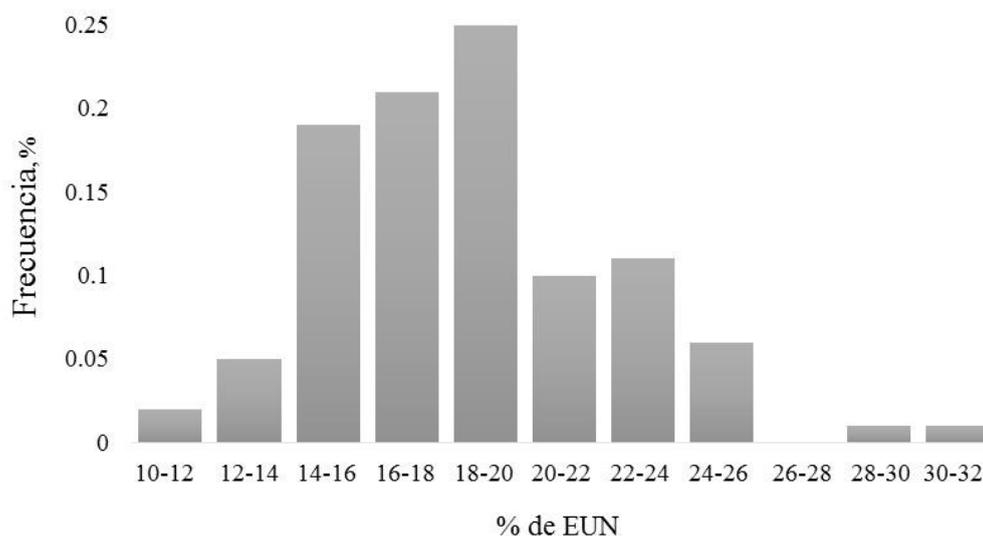


**Figura 2.19:** Excreción de nitrógeno en función del nivel de proteína bruta (PB) de la dieta en 122 tambos de la Región Pampeana, Argentina.

**Referencias:** Secreción en leche (●) y en heces + orina (●).

Para el caso de la EUN (Figura 2.20), en general fue baja ( $18,6 \pm 3,52$  %). Se observan

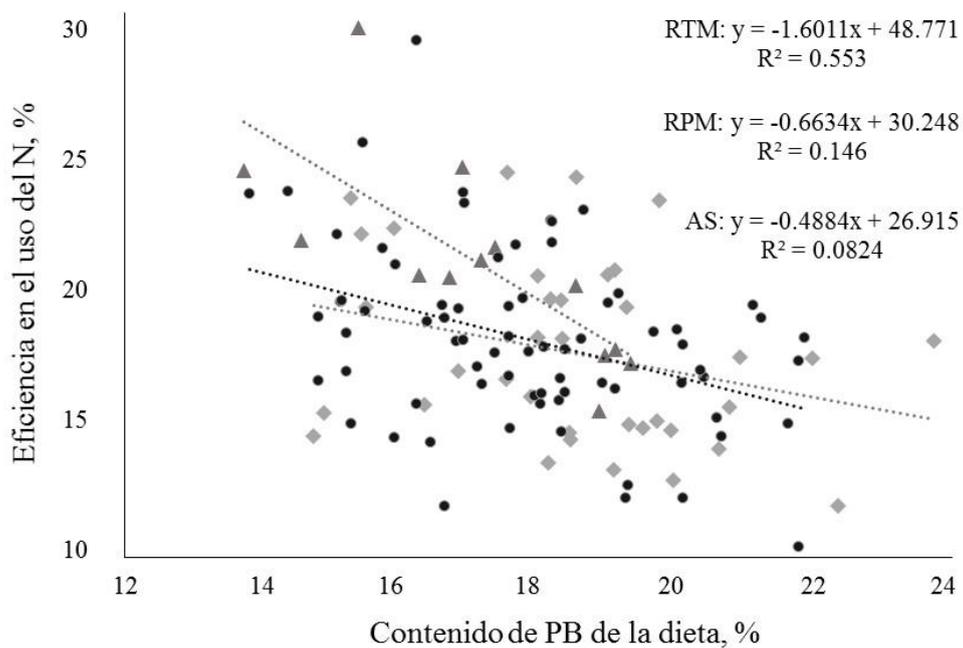
mayores frecuencias de valores por debajo del 20-22% de EUN y pocos casos ( $n = 9$ ) con una EUN por encima del 24%, siendo este valor lo mínimo recomendado por la diferente bibliografía internacional analizada previamente en este capítulo (apartado 2.5).



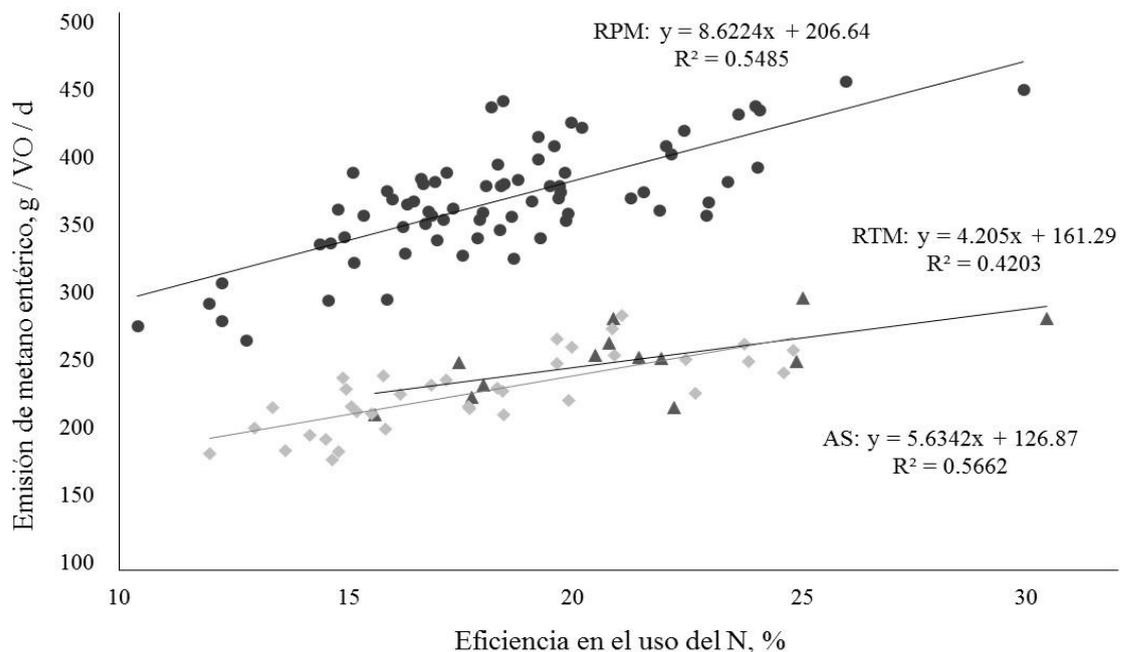
**Figura 2.20:** Frecuencias relativas de los niveles de EUN (%) de la dieta en vacas en ordeño en 122 tambos de la Región Pampeana, Argentina.

Al evaluar la EUN según el contenido de PB de las dietas utilizadas (Figura 2.21), se observó la siguiente tendencia, a medida que el contenido de PB de la dieta fue mayor, la EUN disminuye ( $r^2 = 0,17$ ). Sin embargo, el comportamiento de dicha relación varió según el sistema de alimentación existiendo una mayor relación lineal en el caso de los sistemas con RTM ( $r^2 = 0,55$ ) con respecto a los RPM ( $r^2 = 0,15$ ) y los sistemas que entregaron alimentos por separado ( $r^2 = 0,08$ ). En base a las pendientes observadas en la figura, los sistemas que consumen RTM lograron obtener valores de EUN mayores con respecto a los RPM y aquellos que consumieron los alimentos por separado (AS). Estos últimos presentaron un comportamiento con respecto a la EUN, observándose una gran variación en la misma a través de los diferentes niveles de PB consumida. Por lo tanto, en los sistemas AS el nivel de consumo de PB por sí sólo no explica los niveles de EUN.

Con respecto a la emisión de  $\text{CH}_4$  entérico en función de la EUN (Figura 2.24), se puede observar que existe una tendencia a que en aquellos sistemas en los cuales la EUN es mayor, la emisión de  $\text{CH}_4$  también fue levemente mayor ( $r^2 = 0,09$ ). Sin embargo, al evaluar dicha relación según el sistema de alimentación, se observó una mayor relación lineal en el caso de los RPM ( $r^2 = 0,55$ ) con respecto a los AS ( $r^2 = 0,57$ ) y los RTM ( $r^2 = 0,42$ ).



**Figura 2.21:** Eficiencia en el uso del N en función del nivel de proteína bruta (PB) de la dieta según el sistema de alimentación en 122 tambos de la Región Pampeana, Argentina. **Referencias:** ración parcialmente mezclada (●); alimentos por separado (◆); ración totalmente mezclada (▲).



**Figura 2.22:** Emisión de metano entérico (g / VO / día), en función de la eficiencia en el uso del N según el sistema de alimentación en 122 tambos de la Región Pampeana, Argentina. **Referencias:** ración parcialmente mezclada (●); alimentos por separado (◆); ración totalmente mezclada (▲).

## En síntesis

En términos generales, los valores de PB de las dietas entregadas a vacas en ordeño en los sistemas de Argentina fueron altos con respecto a las recomendaciones internacionales para el caso de dietas que permitan una mejor EUN combinado con una menor excreción de N y, como resultado, una menor eliminación de N al ambiente. Al mismo tiempo, las EUN observadas fueron menores a las deseadas. Esto demuestra que aún quedan muchas estrategias por hacer en los sistemas argentinos para mejorar este indicador. Con respecto a la emisión de metano y su relación con la EUN, se puede ver que aquellos sistemas que fueron más eficientes en el uso del N, emitieron más CH<sub>4</sub> entérico por vaca. Por lo tanto, se debe ser precavidos en la implementación de estrategias que sólo tiendan a aumentar la EUN, ya que podrían ser perjudiciales con respecto a las emisiones de metano. Para ello se precisan realizar evaluaciones en conjunto, y así, a futuro, poder identificar dietas o estrategias de manejo que sean beneficiosas para ambos indicadores ambientales.

## 2.8. REFERENCIAS

- AFRC, (1993). Agricultural and Food Research Council. Energy and protein requirements of ruminants. Wallingford (UK). CAB International
- Aguerre, M.J.; Wattiaux, M.A.; Hunt, T.; Larget, B.R. (2010). Effect of dietary crude protein on ammonia-N emission measured by herd nitrogen mass balance in a freestall dairy barn managed under farm-like conditions. *Animal*. **4** (8), 1390–1400.
- Akayezu, J.M.; Hansen, W.P.; Otterby, D.E.; Crooker, B.A.; Marx, G.D. (1997). Yield response of lactating Holstein dairy cows to dietary fish meal or meat and bone meal. *J. Dairy Sci.* **80**, 2950–2963.
- Alio, A.; Theurer, C.B.; Lozano, O.; Huber, J.T.; Swingle, R.S.; Delgado-Elorduy, A.; Duneo, P.; de Young, D.; Webb Jr., K.E. (2000). Splanchnic nitrogen metabolism by growing beef steers fed diets containing sorghum grain flaked at different densities. *J. Anim. Sci.* **78**, 1355-1363.

- Almeida, J.G.R.; Dall-Orsoletta, A.C.; Oziemblowski, M.M.; Michelon, G.M.; Bayer, C.; Edouard, N.; Ribeiro-Filho, H.M.N. (2020). Carbohydrate-rich supplements can improve nitrogen use efficiency and mitigate nitrogenous gas emissions from the excreta of dairy cows grazing temperate grass. *Animal*. **7**, 1-12.
- Amon, B.; Kryvoruchko, V.; Amon, T.; Zechmeister-Boltenstern, S. (2006). Methane, nitrous oxide and ammonia emissions during storage and after application of dairy cattle slurry and influence of slurry treatment. *Agriculture Ecosystems and Environment*. **112(2-3)**, 153-162.
- Archimède, H.; Eugène, M.; Marie Magdeleine, C.; Boval, M.; Martin, C.; Morgavi, D.P.; Lecomte, P.; Doreau, M. (2011). Comparison of methane production between C3 and C4 grasses and legumes. *Anim. Feed Sci. Technol.* **166–167**, 59–64.
- Arriaga Sasieta, H. (2010). Cattle nutrition as a strategy to mitigate gaseous nitrogen losses from dairy farming. Tesis doctorado. [http://www.euskadi.eus/contenidos/documentacion/tesis\\_doctorales/es\\_agripes/adjuntos/tesis\\_doctoral70.pdf](http://www.euskadi.eus/contenidos/documentacion/tesis_doctorales/es_agripes/adjuntos/tesis_doctoral70.pdf).
- Austin, C.L.; Schingoethe, D.J.; Casper, D.P.; Cleale, R.M. (1991). Influence of bovine somatotropin and nutrition on production and composition of milk from dairy cows. *J. Dairy Sci.* **74(11)**, 3920-3932.
- Bach, A.; Calsamiglia, S.; Stern, M.D. (2005). Nitrogen metabolism in the rumen. *J. Dairy Sci.* **88**, E9–E21.
- Ballantine, D.; Davies-Colley, R.J. (2014). Water quality trends in New Zealand Rivers: 1989-2009. *Environmental Monitoring and Assessment*. **186**, 1939-1950.
- Bannink, A.; Kogut, J.; Dijkstra, J.; France, J.; Kebreab, E.; Van Vuuren, A.M. (2006). Estimation of the stoichiometry of volatile fatty acid production in the rumen of lactating cows. *J. Theor. Biol.* **238**, 36–51.
- Bannink, A.; Smits, M.C.J.; Kebreab, E.; Mills, J.A.N.; Ellis, J.L.; Klop, A.; France, J.; Dijkstra, J. (2010). Simulating the effects of grassland management and grass ensiling on methane emission from lactating cows. *Journal of Agricultural Science*. **148**, 55–72.
- Bartley, E.E.; Davidovich, A.D.; Barr, G.W.; Griffel, G.W.; Dayton, A.D.; Deyoe, C.W.; Bechtel,

- R.M. (1976). Ammonia toxicity in cattle. I. Rumen and blood changes associated with toxicity and treatment methods. *Journal of Animal Science*. **43**, 835-841.
- Beauchemin, K.A.; Kreuzer, M.; O'Mara, F.; McAllister, T.A. 2008. Nutritional management for enteric methane abatement: a review. *Aust. J. Ep. Agric.* **48**, 21–27.
- Belanche, A.; Doreau, M.; Edwards, J.E.; Moorby, J.M.; Pinloche, E.; Newbold, C.J. (2012). Shifts in the rumen microbiota due to the type of carbohydrate and level of protein ingested by dairy cattle are associated with rumen fermentation. *J. Nutr.* **142**, 1684–1692.
- Beltrán-Santoyo, M.A.; Álvarez-Fuentes, M.A.G.; Pinos-Rodríguez, J.M.; Contreras-Servín, C. (2016). Emisión de metano en los sistemas de producción de leche bovina en el valle de san luis potosí, México. *Agrociencia*. **50** (3), 297- 305.
- Beukes, P.C.; Romera, A.J.; Gregorini, P.; Macdonald, K.A.; Glassey, C.B.; Shepherd, M.A. (2017). The performance of an efficient dairy system using a combination of nitrogen leaching mitigation strategies in a variable climate. *Sci. Total Environ.* **599-600**, 1791-1801.
- Beukes, P.C.; Romera, A.J.; Hutchinson, K.; van der Weerden, T.; de Klein, C.; Dalley, D.; Chapman, D.; Glassey, C.; Dyne, R. (2019). Benefits and Trade-offs of Dairy System Changes Aimed at Reducing Nitrate Leaching. *Animals*. **9**, 1158.
- Boadi, D.A.; Wittenberg, K.M. (2002). Methane production from dairy and beef heifers fed forages differing in nutrient density using the sulphur hexafluoride (SF6) tracer gas technique. *Can. J. Anim. Sci.* **82**, 201–206.
- Bonhomme, A. (1990). Rumen ciliates: Their metabolism and relationships with bacteria and their hosts. *Anim. Feed. Sci. Technol.* **30**, 203 – 266.
- Børsting, C.F.; Kristensen, T.; Misciatelli, L.; Hvelplund, T.; Weisbjerg, M.R. (2003). Reducing nitrogen surplus from dairy farms: effect of feeding and management. *Livest. Prod. Sci.* **83**, 165–178.
- Bosshard, C.; Oberson, A.; Leinweber, P.; Jandi, G.; Knicker, H.; Wettstein, H.R.; Kreuzer, M.; Frossard, E., (2011). Characterization of fecal nitrogen forms produced by a sheep fed with <sup>15</sup>N labeled ryegrass. *Nutr. Cycl. Agroecosyst.* **90**, 355–368.
- Brask, M.; Lund, P.; Hellwing, A.L.F.; Poulsen, M.; Weisbjerg, M.R. (2013). Enteric methane

production, digestibility and rumen fermentation in dairy cows fed different forages with and without rapeseed fat supplementation. *Anim. Feed Sci. Technol.* **184**, 67–79.

Broderick, G.A. (2003). Effects of varying dietary protein and energy levels on the production of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* **86**, 1370-1381

Broderick, G.A. (2005). Feeding Dairy Cows to Minimize Nitrogen Excretion. Tri-State Dairy Nutrition Conference. [file:///C:/Users/tieri.maria/Downloads/Feeding\\_dairy\\_cows\\_to\\_minimize\\_nitrogen\\_excretion%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/tieri.maria/Downloads/Feeding_dairy_cows_to_minimize_nitrogen_excretion%20(1).pdf)

Broderick, G.A.; Clayton, M.K. (1997). A statistical evaluation of animal and nutritional factors influencing concentrations of milk urea nitrogen. *J. Dairy Sci.* **80**, 2964–2971.

Broderick, G.A.; Stevenson, M.J.; Patton, R.A. (2009). Effect of dietary protein concentration and degradability on response to rumen-protected methionine in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* **92**, 2719–2728.

Broderick, G.A.; Stevenson, M.J.; Patton, R.A.; Lobos, N.E.; Olmos Colmenero, J.J. (2008). Effect of supplementing rumen-protected methionine on production and nitrogen excretion in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* **92**, 2719–2728.

Burgos, S.A.; Embertson, N.M.; Zhao, Y.; Mitloehner, F.M.; DePeters, E.J.; Fadel, J.G. (2010). Prediction of ammonia emission from dairy cattle manure based on milk urea nitrogen: Relation of milk urea nitrogen to ammonia emissions. *J. Dairy Sci.* **93**, 2377–2386.

Burgos, S.A.; Fadel, J.G.; DePeters, E.J. (2007). Prediction of ammonia emissions from dairy cattle manure based on milk urea nitrogen: Relation of milk urea nitrogen to urine urea nitrogen excretion. *J. Dairy Sci.* **90**, 5499–5508.

Burkholder, J.; Libra, B.; Weyer, P.; Heathcote, S.; Kolpin, D. (2007). Impacts of waste from concentrated feeding operations on water quality. *Environ. Health Perspect.* **115**, 308-312.

Bussink, D.W.; Oenema, O. (1998). Ammonia volatilization from dairy farming systems in temperate areas: A review. *Nutr. Cycl. Agroecosyst.* **51**, 19–33.

CAA. (2007). Código Alimentario Argentino. Capítulo XII: Bebidas hídricas, agua y agua gasificada. [http://www.anmat.gov.ar/alimentos/codigoa/CAPITULO\\_XII.pdf](http://www.anmat.gov.ar/alimentos/codigoa/CAPITULO_XII.pdf)

- Calsamiglia, S.; Ferret, A.; Reynolds, C.K.; Kristensen, N.B.; van Vuuren, A.M. (2010). Strategies for optimizing nitrogen use by ruminants. *Animal*, **47**, 1184–1196.
- Cantalapiedra-Hijar, G.; Fouillet, H.; Huneau, J.F.; Fanchone, A.; Doreau, M.; Nozière, P.; Ortigues-Marty, I. (2016). Relationship between efficiency of nitrogen utilization and isotopic nitrogen fractionation in dairy cows: contribution of digestion v. metabolism? *Animal*. **10** (2), 221–229.
- Cantalapiedra-Hijar, G.; Ortigues-Marty, I.; Sepchat, B.; Agabriel, J.; Huneau, J.; Fouillet, H. (2015). Diet–animal fractionation of nitrogen stable isotopes reflects the efficiency of nitrogen assimilation in ruminants. *British Journal of Nutrition*, **113** (7), 1158-1169.
- Cantalapiedra-Hijar, G.; Peyraud, J.L.; Lemosquet, S.; Molina-Alcaide, E.; Boudra, H.; Nozière, P.; Ortigues-Marty, I. (2014). Dietary carbohydrate composition modifies the milk N efficiency in late lactation cows fed low crude protein diets. *Animal*. **8**, 275–285.
- Capper, J.L.; Cady, R. A.; Bauman, D.E. (2009). The environmental impact of dairy production: 1944 compared with 2007. *J. Anim. Sci.* **87** (6), 2160–2167. Castillo, A.R.; Kebreab, E.; Beever, D.E.; Barbi, J.H.; Sutton, J.D.; Kirby, H.C.; France, J. (2001). The effect of protein supplementation on nitrogen utilization in lactating dairy cows fed grass silage diets. *J. Anim. Sci.* **79**, 247–253.
- Castillo, A.R.; Kebreab, E.; Beever, D.E.; France, J. (2000). A review of efficiency of nitrogen utilisation in lactating dairy cows and its relationship with environmental pollution. *Journal of Animal and Feed Science*. **9**, 1–32.
- Castillo, A.R.; Kebreab, E.; Beever, D.E.; Barbi, J.H.; Sutton, J.D.; Kirby, H.C.; France, J. (2001). The effect of protein supplementation on nitrogen utilization in lactating dairy cows fed grass silage diets. *J. Anim. Sci.* **79**, 247–253.
- Centeno, A. (2013). Intensificación en el tambo. ¿Qué cambió? Hoja de información técnica N°33 INTA UEEA San Francisco. ISSN: 2250-8546.
- Chaves, A.V.; Thompson, L.C.; Iwaasa, A.D.; Scott, S.L.; Olson, M.E.; Benchaar, C.; Veira, D.M.; McAllister, T.A. (2006). Effect of pasture type (alfalfa vs. grass) on methane and carbon dioxide production by yearling beef heifers. *Can. J. Anim. Sci.* **86**, 409–418.

- Chen, Y.; Harrisonb, J.H.; Buntingc, L.D. (2018). Effects of replacement of alfalfa silage with corn silage and supplementation of methionine analog and lysine-HCl on milk production and nitrogen feed efficiency in early lactating cows. *Animal Feed Science and Technology*. **242**, 120–126.
- Cheng, L.; Kim, E.J.; Merry, R.J.; Dewhurst, R.J. (2011). Nitrogen partitioning and isotopic fractionation in dairy cows consuming diets based on a range of contrasting forages. *J. Dairy Sci.* **94**, 2031–2041.
- Chiavegato, M.B.; Powers, W.; Palumbo, N. (2015). Ammonia and greenhouse gas emissions from housed Holstein steers fed different levels of diet crude protein. *J Anim Sci*. **93**, 395–404.
- Chizzotti, M.L.; Valadares, S.C.; Valadares Filho, R.F.D. (2008). Determination of creatinine excretion and evaluation of spot urine sampling in Holstein cattle. *Livestock Science*. **113 (2-3)**, 218-225.
- Clark, D.A.; Caradus, J.R.; Monaghan, R.M.; Sharp, P.; Thorrold, B.S. (2007). Issues and options for improved dairy farming in New Zealand. *N. Z. J. Agric. Res.* **50**, 203-221.
- Colmenero, O.J.J.; Broderick, G.A. (2006a). Broderick effect of dietary crude protein concentration on milk production and nitrogen utilization in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* **89**, 1704-1712.
- Colmenero, O.J.J.; Broderick, G.A. (2006b). Effect of dietary crude protein concentration on ruminal nitrogen metabolism in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* **89**, 1694-1703.
- Corea, E.E.; Aguilara, J.M.; Alasa, N.P.; Alasa, E.A.; Floresa, J.M.; Broderick, G.A. (2017). Effects of dietary cowpea (*Vigna sinensis*) hay and protein level on milk yield, milk composition, N efficiency and profitability of dairy cows. *Animal Feed Science and Technology*. **226**, 48–55.
- Cressman, S.G.; Grieve, D.G.; Macleod, G.K.; Wheeler, E.E.; Young, L.G. (1980). Influence of dietary protein concentration on milk production by dairy cattle in early lactation. *J. Dairy Sci.* **63**, 1839–1847.
- Cronje, P. (2000). Ruminant physiology; digestion, metabolism, growth and reproduction. New York, United States of America: Cabi Publishing.

- Cyriac, J.; Rius, A.G.; McGilliard, M.L.; Pearson, R.E.; Bequette, B.J.; Hanigan, M.D. (2008). Lactation performance of mid-lactation dairy cows fed ruminally degradable protein at concentrations lower than national research council recommendations. *J. Dairy Sci.* **91**, 4704–4713.
- DairyCo, (2013). The effect of reducing dietary crude protein on nitrogen utilisation, milk production, health and fertility in dairy cows. [https://dairy.ahdb.org.uk/media/864752/411098\\_fs2\\_protein\\_review\\_branded.pdf](https://dairy.ahdb.org.uk/media/864752/411098_fs2_protein_review_branded.pdf).
- Dalgaard, T.; Bienkowski, J.F.; Bleeker, A.; Drouet, J.L.; Durand, P.; Dragosits, U.; Frumau, A.; Hutchings, N.J.; Kedziora, A.; Magliulo, V.; Olesen, J.E.; Theobald, M.R.; Maury, O.; Akkal, N.; Cellier, P. (2012). Farm nitrogen balances in six European agricultural landscapes – a method for farming system assessment, emission hotspot identification, and mitigation measure evaluation, *Biogeosciences Discuss.* **9**, 8859–8904.
- de Klein, C.A.M., Eckard, R.J., (2008). Targeted technologies for nitrous oxide abatement from animal agriculture. *Aust. J. Exp. Agric.* **48**, 14–20.
- DePeters, E.J.; Ferguson, J.D. (1992). Nonprotein Nitrogen and Protein Distribution in the Milk of Cows. *J Dairy Sci.* **75**, 3192-3209.
- Dewhurst, R.J.; Thomas, C. (1992). Modelling of nitrogen transactions in the dairy cow and their environmental consequences. *Livest. Prod. Sci.* **31**, 1-16.
- Di, H.J.; Cameron, K.C. (2005). Reducing environmental impacts of agriculture by using a fine particle suspension nitrification inhibitor to decrease nitrate leaching from grazed pastures. *Agriculture, Ecosystems and Environment.* **109**, 202-212.
- Dijkstra, J.; France, J.; Davies, D.R. (1998). Different mathematical approaches to estimating microbial protein supply in ruminants. *J. Dairy Sci.* **81**, 3370–3384.
- Dijkstra, J.; France, J.; Ellis, J.L.; Kebreab, E.; López, S.; Reijs, J.W.; Bannink, A. (2010). Effects of nutritional strategies on simulated nitrogen excretion and methane emission in dairy cattle. In *Modelling Nutrient Digestion and Utilisation in Farm Animals*. Edited by Sauvant D, van Milgen J, Faverdin P, Friggens N. Wageningen: Wageningen Academic Publisher, 394-402.
- Dijkstra, J.; Oenema, O.; Bannink, A. (2011). Dietary strategies to reducing N excretion from

- cattle: Implications for methane emissions. *Curr. Opin. Environ. Sustainability*. **3**, 414–422.
- Dijkstra, J.; France, J.; Ellis, J.L.; Strathe, A.B.; Kebreab, E.; Bannink, A. (2013a). Production efficiency of ruminants: feed, nitrogen and methane. In: Kebreab, E. (editor), Sustainable animal agriculture. CAB International, Wallingford, UK, in press.
- Dijkstra, J.; Oenema, O.; van Groenigen, J.W.; Spek, J.W.; van Vuuren, A.M.; Bannink, A. (2013b). Diet effects on urine composition of cattle and N<sub>2</sub>O emissions. *Animal*. **7** (2), 292–302.
- Dijkstra, J.; Reynolds, C.K.; Kebreab, E.; Bannink, A.; Ellis, J.L.; France, J.; van Vuuren, A.M. (2013c). Challenges in ruminant nutrition: towards minimal nitrogen losses in cattle. Energy and protein metabolism and nutrition in sustainable animal production. 47-58.
- Dijkstra, J.; Bannink, A.; Bosma<sup>1</sup>, P.M.; Lantinga, E.A.; Reijs, J.W. (2018). Modeling the Effect of Nutritional Strategies for Dairy Cows on the Composition of Excreta Nitrogen. *Front. Sustain. Food Syst.* 2:63.
- Dou, Z.; Lanyon, L.E.; Ferguson, J.D.; Kohn, R.A.; Boston, R.C.; Chalupa, W. (1998). An integrated approach to managing nitrogen on dairy farms: Evaluating farm performance using dairy nitrogen planner. *Agronomy Journal*. **90**(5), 573-581
- Edouard, N.; Hassouna, M.; Robin, P.; Faverdin, P. (2016). Low degradable protein supply to increase nitrogen efficiency in lactating dairy cows and reduce environmental impacts at barn level. *Animal*. **10** (2), 212–220.
- Ellis, J.L.; Dijkstra, J.; France, J.; Parsons, A.J.; Edwards, G.R.; Rasmussen, S.; Kebreab, E.; Bannink, A. (2012). Effect of high-sugar grasses on methane emissions simulated using a dynamic model. *J. Dairy Sci.* **95**, 272-285.
- Elzing, A.; Monteny, G.J. (1997). Ammonia emission in a scale model of a dairy-cow house. *Trans. ASAE*. **40**, 713-720.
- Fanchone, A.; Nozière, P.; Portelli, J.; Duriot, B.; Largeau, V.; Doreau, M. (2014). Effects of nitrogen underfeeding and energy source on nitrogen ruminal metabolism, digestion, and nitrogen partitioning in dairy cows. *J. Anim. Sci.* **91**, 895–906.
- FAO, (2006). *Livestock's Long Shadow: Environmental Issues and Options*. Food and Agriculture

Organization, Rome, Italy.

FAO, (2011). World Livestock 2011 – Livestock in Food Security. FAO, Rome.

FAO, (2018). El sector lechero mundial: Datos. <http://www.dairydeclaration.org/Portals/153/FAO-Global-Facts-SPANISH-F.PDF?v=1>

Faverin, C.; Tieri, M.P.; Herrero, M.A. (2019). Metodologías de cálculo de emisiones de gases de efecto invernadero en ganadería bovina. Capítulo 5. *Rev. Arg. Prod. An.* **39** (2), 87-104.

Fenn, M.E.; Haeuber, R.; Tonnesen, G.S.; Baron, J.S.; Grossman-Clarke, S.; Hope, D.; Jaffe, D.A.; Copeland, S.; Geier, L.; Rueth, H.M.; Sickman, J.O. (2003). Nitrogen emissions, deposition, and monitoring in the Western United States. *BioScience*. **53**, 391-403

FIL-IDF, (2018). The world dairy situation 2018. <https://store.fil-idf.org/wp-content/uploads/2018/10/WDS2018Preview-1.pdf>

Firkins, J.L. (1996). Maximizing microbial protein synthesis in the rumen. *Journal of Nutrition*. **126**, 1347S– 1354S.

Firkins, J.L.; Reynolds, C. (2005). Whole-animal Nitrogen Balance in Cattle. In: Nitrogen and Phosphorus Nutrition of Cattle Reducing the Environmental Impact of Cattle Operations. Eds E Pfeffer, A Hristov. The Centre for Agriculture and Bioscience International Publishing: Cambridge, MA. 167-186.

Foote, K.J.; Joy, M.K.; Death, R.G. (2015). New Zealand dairy farming: milking our environment for all its worth. *Environmental management*. **56**, 709-720.

Frank, B.; Swensson, C. (2002). Relationship between content of crude protein in rations for dairy cows and milk yield, concentration of urea in milk and ammonia emissions. *J. Dairy Sci.* **85**, 1829–1838.

Galindo, G.; Herrero, M.A.; Korol, S.; Fernández Cirelli, A. (2004). Water resources in the Salado river drainage basin of Buenos Aires, Argentina. Chemical and microbiological characteristics. *Int. J. Water Res.* **29**(1), 81-91.

Galloway, J.N.; Cowling, E.B. (2002). Reactive nitrogen and the world: Two hundred years of change. *Ambio*. **31**, 64–71.

- Galloway, J.N.; Schlesinger, W.H.; Levy, H.; Michaels, A.; Schnoor, J.L. (1995). Nitrogen fixation: Anthropogenic enhancement—environmental response. *Global Biogeochemical Cycles*. **9**, 235–252.
- Galloway, J.N.; Dentener, F.J.; Capone, D.G.; Boyer, E.W.; Howarth, R.W.; Seitzinger, S.P.; Asner, G.P.; Cleveland, C.C.; Green, P.A.; Holland, E.A.; Karl, D.M.; Michaels, A.F.; Porter, J.H.; Townsend, A.R.; Vöosmarty, C.J. (2004). Nitrogen cycles: Past, present, and future. *Biogeochemistry*. **70**, 153–226.
- Galloway, J.N.; Townsend, A.R.; Erisman, J.W.; Bekunda, M.; Cai, Z.; Freney, J.F.; Marteinelli, L.A.; Seitzinger, S.P.; Sutton, M.A., (2008). Transformations of the nitrogen cycle: recent trends, questions, and potential solutions. *Science*. **320**, 889–892.
- Galloway, J.N.; Winiwarter, W.; Leip, A.; Leach, A.M.; Bleeker, A.; Erisman, J.W. (2014). Nitrogen footprints: past, present and future. *Environ. Res. Lett.* **9**, 1-11.
- Garrett, K.; Beck, M.R.; Gregorini, P. (2019). Strategic feeding management to mitigate enteric methane emissions and urinary nitrogen excretion. *New Zealand Journal of Animal Science and Production*. **79**, 20-25.
- Gerber, P.; Hristov, A.; Henderson, B.; Makkar, H.; Oh, J.; Lee, C.; Meinen, R.; Montes, F.; Ott, T.; Firkins, J. (2013). Technical options for the mitigation of direct methane and nitrous oxide emissions from livestock: a review. *Animal*. **7**, 220–234
- Godden, S.M.; Lissemore, K.D.; Kelton, D.F.; Leslie, K.E.; Lumsden, J.H. (2001). Relationship between milk urea concentrations and nutritional management, production and economic variables in Ontario dairy herds. *J. Dairy Sci.* **84**, 1128-1139.
- Gonda, H.L.; Lindberg; J.E. (1994). Evaluation of Dietary Nitrogen Utilisation in Dairy Cows Based on Urea Concentrations in Blood, Urine and Milk, and on Urinary Concentration of Purine Derivatives. *Acta Agric. Scand., Sect. A, Animal Sci.* **44**, 236 - 245.
- Gregorini, P.; Beukes, P.C.; Dalley, D.; Romera, A.J. (2016). Screening for diets that reduce urinary nitrogen excretion and methane emissions while maintaining or increasing production by dairy cows. *Sci Total Environ.* **551–552**, 32–41.
- Grings, E.E.; Roffler, R.E.; Deitelhoff, D.P. (1991). Response of dairy cows in early lactation to

- additions of cottonseed meal in alfalfa-based diets. *J. Dairy Sci.* **74(8)**, 2580-2587.
- Guo, Y.Q.; Tong, B.X.; Wu, Z.G.; Ma, W.Q.; Ma, L. (2019). Dietary manipulation to reduce nitrogen and phosphorus excretion by dairy cows. *Livestock Science.* **228**, 61–66.
- Gutman, G.; Guiguet, E.; Lavarello, P. (2003). Ciclos sectoriales y políticas macroeconómicas. Reflexiones acerca de los ciclos en la lechería argentina a la luz de las experiencias internacionales.
- Hall, M.B.; Huntington, G.B. (2008). Nutrient synchrony: Sound in theory, elusive in practice. *J. Anim. Sci.* **86(E. Suppl.)**, E287-E292
- Haque, M.N.; Rulquin, H.; Andrade, A.; Faverdin, P.; Peyraud, J.L.; Lemosquet, S. (2012). Milk protein synthesis in response to the provision of an “ideal” amino acid profile at 2 levels of metabolizable protein supply in dairy cows. *J. Dairy Sci.* **95**, 5876–5887
- Harmeyer, J.; Martens, H. (1980). Aspects of urea metabolism in ruminants with reference to the goat. *J. Dairy Sci.* **63**, 1707-1728.
- Haynes, R.J.; Williams, P.H. (1993). Nutrient cycling and soil fertility in the grazed pasture ecosystem. *Adv. Agron.* **49**, 171–173.
- Hendriks, S. (2016). The effect of dietary nitrogen on nitrogen partitioning and milk production in grazing dairy cows. Thesis presented in partial fulfilment of the requirements for the Master of Animal Science at Massey University Palmerston North, New Zealand.
- Herrero, A.; Tieri, M.P. (2014). Manejo del agua en sistemas ganaderos. Capítulo 2, 35-63 pp. En: La producción y el ambiente, 1° edición, 224 - 234.
- Herrero, M.A.; Carbó, L.I.; Sardi, G.M.; Gutierrez, G.; Urquiza, M.; Volpe, S.M.; Flores, M.C.; Ormazabal, J.J.; Cariola, A.; Carcagno L.; Malheim, F. (2008). Efecto de fuentes nitrogenadas y momentos de aplicación sobre la productividad bienal de raigrás anual. *Rev. Arg. Prod. An.* **28 (S1)**, 354-355.
- Herrero, M.A.; Gil S.B. (2008). Consideraciones ambientales de la intensificación en producción animal. *Ecol. Austral.* **18 (3)**, 273 – 289.
- Herrero, M.A.; Gil, S.B.; Sardi, G.M.; Flores, M.C.; Carbó, L.I.; Orlando, A.A. (2006).

Transferencia de nutrientes del área de pastoreo a la de ordeño en tambos semiextensivos en Buenos Aires, Argentina. *Revista InVet.* **8**, 23-30.

Herrero, M.A.; Iramain, M.S.; Korol, S.; Flores, M.; Pol, M. (2002). Calidad de agua y contaminación en tambos de la cuenca lechera de abasto sur. *Rev. Arg. Prod. An.* **22(1)**, 61-70.

Herrero, M.A.; Thiel, I. (2002). Water contamination from rural production systems. En: Donoso, MC (Ed.). Water for food and agriculture in the Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS) **3**, 1-35. Developed under the Auspices of the UNESCO Eolss Publishers, Oxford, UK.

Higgs, R.J. (2009). Nitrogen use efficiency and sustainable nitrogen management in high producing dairy farms. A Thesis Presented to the Faculty of the Graduate School of Cornell University.

<http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.1003.2447&rep=rep1&type=pdf>

Hoekstra, N.; Holshof, G.; Zom, R.; Philipsen, B.; Schils, R.; van Eekeren, N. (2020). The Effect of Grazing System and Level of Concentrate Protein Feeding on Milk Production and N Use Efficiency of Dairy Cows on Peat Meadows. *Sustainability.* **12**, 1055.

Holter, J.B.; Urban, W.E. Jr. (1992). Water partitioning and intake prediction in dry and lactating Holstein cows. *J. Dairy Sci.* **75**, 1472– 1479.

Hristov, A.N.; Ropp, J.K. (2003). Effect of dietary carbohydrate composition and availability on utilization of ruminal ammonia nitrogen for milk protein synthesis in dairy cows. *J. Dairy Sci.* **86**, 2416–2427.

Hristov, A.N.; Price, W.J.; Shafii, B. (2004). A meta-analysis examining the relationship among dietary factors, dry matter intake, and milk and milk protein yield in dairy cows. *J. Dairy Sci.* **87**, 2184-2196.

Hristov, A.N.; Jounary, J.P. (2005). Factors affecting the efficiency of nitrogen utilization in the rumen, in: Pfeffer, E., Hristov, A.N. (Eds.), Nitrogen and Phosphorus Nutrition of Cattle. CABI Publishing, Cambridge. 117-166.

Hristov, A.N.; Oh, J.; Firkins, J.; Dijkstra, J.; Kebreab, E.; Waghorn, G.; Adesogan, A.; Yang, W.;

- Tricarico, J.; Lee, C.; Gerber, P.J.; Henderson, B. Makkar, H.P.S. (2013). Mitigation of methane and nitrous oxide emissions from animal operations: I. A review of enteric methane mitigation options. *J Anim. Sci.* **91**(11), 5045-69.
- Hristov, A.N.; Giallongo, F. (2014). Feeding protein to dairy cows—what should be our target?. Proc Tri-State Dairy Nutr Conference; Fort Wayne, IN. 75–84.
- Huhtanen, P.; Hristov, A.N. (2009). A meta-analysis of the effects of dietary protein concentration and degradability on milk protein yield and milk N efficiency in dairy cows. *J. Dairy Sci.* **92**, 3222–3232.
- Huhtanen, P.; Nousiainen, J.I.; Rinne, M.; Kytölä, K.; Khalili, H. (2008). Utilization and partition of dietary nitrogen in dairy cows fed grass silage-based diets. *J. Dairy Sci.* **91**, 3589–3599.
- Huntington, G.B. (1986). Uptake and transport of nonprotein nitrogen by the ruminant gut. *Fed. Proc.* **45**, 2272–2276.
- Huntington, G.B. (1989). Hepatic urea synthesis and site and rate of urea removal from blood of beef steers fed alfalfa hay or a high concentrate diet. *Can. J. Anim. Sci.* **69**, 215-223.
- Huntington, G.B.; Archibeque, S.L. (2000). Practical aspects of urea and ammonia metabolism in ruminants. *J. Anim. Sci.* **77** (1), 1–11.
- Hutjens, M.; Chase, L.E. (2012). Interpreting milk urea nitrogen (MUN) values. Extension - America's research-based learning network. <https://articles.extension.org/pages/11322/interpreting-milk-urea-nitrogen-mun-values>.
- IPCC, (2001). Climate change 2001: the scientific basis. In: Houghton, J.T., Ding, Y., Griggs, D.J., Noguera, M., van der Linden, P.J., Dai, X., Maskell, K., Johnson, C.A. (Eds.), Contribution of Working Group I to the Third Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge University Press, Cambridge, New York, 881 pp.
- IPCC. (2006). Guidelines for National Greenhouse Gas Inventories, Prepared by the National Greenhouse Gas Inventories Program. H. S. Eggleston, L. Buendia, K. Miwa, T. Ngara, and K. Tanabe, ed. IGES, Kanagawa, Japan. <http://www.ipcc-nggip.iges.or.jp/public/2006gl/index.htm>
- Iramain, M.S.; Pol, M.; Korol, S.; Herrero, M.A.; Fortunato, M.S. (2005). Pseudomonas

aeruginosa en agua y leche cruda: un caso de estudio. *Rev InVet.* **7(1)**, 133-137.

- Ishler, V.A. (2017). Interpretation of milk urea nitrogen (MUN) values. The Pennsylvania State University Extension Publication No. 2008-134. <http://extension.psu.edu/animals/dairy/nutrient-management/certified-dairy/tools/interpretation-of-mun-values>
- Jjemba, P. (2003). The potencial impact of veterinary and human therapeutic agents in manure and biosolids on plants grown on arable land: a review. *Agric. Ecosyst. Environ.* **93**:267-278.
- Johnson, K.A.; Johnson, D.E., (1995). Methane emissions from cattle. *J. Anim. Sci.* **73**, 2483–2492.
- Jonker, J.S.; Kohn, R.A.; Erdman, R.A. (1998). Using milk urea nitrogen to predict nitrogen excretion and utilization efficiency in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* **81**, 2681–2692.
- Jonker, J. S.; Kohn, R.A.; High, J. (2002). Dairy herd management practices that impact nitrogen utilization efficiency. *J. Dairy Sci.* **85(5)**, 1218- 1226.
- Jost, D.I.; Jörgensen, R.G.; Sundrum, A. (2013). Effect of cattle faeces with different microbial biomass content on soil properties, gaseous emissions and plant growth. *Biol. Fertil. Soils* **49**, 61–70.
- Kalscheur, K.F.; Vandersall, J.H.; Erdman, R.A.; Kohn, R.A.; Russek-Cohen, E. (1999). Effects of dietary crude protein concentration and degradability on milk production responses of early, mid, and late lactation dairy cows. *J. Dairy Sci.* **82**, 545-554.
- Kauffman, A. J.; St-Pierre, N. (2001). The relationship of milk urea nitrogen excretion in Holstein and Jersey cows. *J. Dairy Sci.* **84**, 2284–2294.
- Kebreab, E.; France, J.; Beever, D.E.; Castillo, A.R. (2001). Nitrogen pollution by dairy cows and its mitigation. *Nutrient Cycling in Agroecosystems.* **60**, 275-285.
- Kebreab, E.; France, J.; Mills, J.A.N.; Allison, R.; Dijkstra, J. (2002). A dynamic model of N metabolism in the lactating dairy cow and an assessment of impact of N excretion on the environment. *J. Anim. Sci.* **80**, 248–259.
- Kebreab, E.; Clarke, K.; Wagner-Riddle, C. (2006). Methane and nitrous oxide emissions from Canadian animal agriculture – a review. *Can. J. Anim. Sci.* **86**, 135- 158.

- Kebreab, E.; Strathe, A.B.; Dijkstra, J.; Mills, J.A.N.; Reynolds, C.K.; Crompton, L.A.; Yan, T.; France J.(2010). Energy and protein interactions and their effect on nitrogen excretion in dairy cows. In: Crovetto, G.M. (ed.), 3rd EAAP international symposium on energy and protein metabolism and nutrition. Wageningen Academic Publishers, Netherlands: 417-425.
- Keim, J.P.; Anrique, R. (2011). Nutritional strategies to improve nitrogen use efficiency by grazing dairy cows. *Chilean Journal of Agricultural Research*, **71** (4), 623-633, 2011.
- Kennedy, P.M.; Milligan, L.P. (1978). Transfer of urea from the blood to the rumen of sheep. *Br. J. Nutr.* **40**, 149–154.
- Khalili, H.; Sairanen, A. (2000). Effect of concentrate type on rumen fermentation and milk production of cows at pasture. *Animal Feed Science and Technology*.**84**, 199-212.
- Kidane, A.; Øverland, M.; Mydland, L.T.; Prestløkken, E. (2018). Interaction between feed use efficiency and level of dietary crude protein on enteric methane emission and apparent nitrogen use efficiency with Norwegian Red dairy cows. *J Anim Sci.* **97**, 3967–3982.
- Knapp, J.R.; Laur, G.L.; Vadas, P.A.; Weiss, W.P.; Tricarico, J.M. (2014). Invited review: Enteric methane in dairy cattle production: Quantifying the opportunities and impact of reducing emissions *J. Dairy Sci.* **97**, 3231–3261.
- Kohn, R.A. (2007). Use of milk or blood urea nitrogen to identify feed management inefficiencies and estimate nitrogen excretion by dairy cattle and other animals. Florida Ruminant Nutrition Symposium, Gainesville, FL. 30–31 Jan. 2007.
- Kohn, R.A.; Dou, Z.; Ferguson, J.D.; Boston, R.C. (1997). A sensitivity analysis of nitrogen losses from dairy farms. *J. Environ. Manage.* **50**, 417–428.
- Kohn, R.A.; French, K.R.; Russen-Cohen, E. (2004). A Comparison of Instruments and Laboratories Used to Measure Milk Urea Nitrogen in Bulk-Tank Milk Samples. *J. Dairy Sci.* **87**, 848-1853.
- Kolver, E.S.; Muller, L.D.; Barry, M.C.; Penno, J.W. (1998). Evaluation and application of the Cornell Net Carbohydrate and Protein System for dairy cows fed diets based on pasture. *J. Dairy Sci.* **81**, 2029-2039.
- Komaragiri, M.; Erdman, R.A. 1997. Factors affecting tissue mobilization in early lactation dairy

- cows: 1. Effect of dietary protein. *J. Dairy Sci.* 80:929–937.
- Lapierre, H.; Lobley, G.E. (2001). Nitrogen recycling in the ruminant: a review. *J. Dairy Sci.* **84** (suppl. E), E223- E236.
- Leal, T.L.; Valadares, R.F.D.; Valadares Filho, S.C.; Leão, M.I.; Detmann, E.; Barbosa, A.M.; Chizzotti, M.L.; Paixão, M.L. (2007). Variações diárias nas excreções de creatinina e derivados de purinas em novilhos. *Revista Brasileira de Zootecnia.* **36** (4), 896-904.
- Ledgard, S.F.; Penno, J.W.; Sprosen, M.S., (1999). Nitrogen inputs and losses from clover/grass pastures grazed by dairy cows, as affected by nitrogen fertilizer application. *J. Agric. Sci.* **132**, 215–225.
- Ledgard, S.; Schils, R.; Eriksen, J.; Luo, J. (2009). Environmental impacts of grazed clover/grass pastures. *Irish Journal of Agricultural and Food Research.* **48**, 209–226.
- Ledgard, S.F.; Wei, S.; Wang, X.; Falconer, S.; Zhang, N.; Zhang, X.; Ma, L. (2019). Nitrogen and carbon footprints of dairy farm systems in China and New Zealand, as influenced by productivity, feed sources and mitigations. *Agricultural Water Management.* **213**, 155–163.
- Lee, C.; Hristov, A.N.; Heyler, K.S.; Cassidy, T.W.; Long M.; Corl, B.A.; Karnati, S.K.R. (2011). Effects of dietary protein concentration and coconut oil supplementation on nitrogen utilization and production in dairy cows. *J. Dairy Sci.* **94**, 5544–5557.
- Lemos, D.G.V. (2015). Evaluación de las emisiones entéricas de metano en vacas lecheras bajo trópico alto con o sin la inclusión de botón de oro (*Tithonia diversifolia*). Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de: Magíster en Ciencias Agrarias Universidad Nacional de Colombia Facultad de Ciencias Agrarias, Departamento de Producción Animal Medellín, Colombia.
- Leng, R. A.; Nolan, J.V. (1984). Nitrogen metabolism in the rumen. *J. Dairy Sci.* **67**, 1027-1089.
- Leonardi, C.; Stevenson, M.; Armentano, L.E. (2003). Effect of two levels of crude protein and methionine supplementation on performance of dairy cows. *J. Dairy Sci.* **86**, 4033–4042.
- Marini, J.C.; Klein, J.D.; Sands, J.M.; Van Amburgh, M.E. (2004). Effect of nitrogen intake on nitrogen recycling and urea transporter abundance in lambs. *J. Animal Sci.* **82** (4), 1157-1164.

- Marini, J.C.; Sands, J.M.; Van Amburgh, M.E. (2006). Urea transporters and urea recycling in ruminants. Wageningen, The Netherlands: Wageningen Academic Publishers.
- Marini, J.C.; Van Amburgh, M.E. (2003). Nitrogen metabolism and recycling in Holstein heifers. *J. Animal Sci.* **81**(2), 545-552.
- Mason, V.C.; Frederiksen, W. (1979). Partitioning of nitrogen in sheep faeces with detergent solutions, and its application to the estimation of the true digestibility of dietary nitrogen and the excretion of non dietary faecal nitrogen. *Z. fur Tierphysiologie Tierernahrung futtermittelkunde.* **41**, 121–131.
- Mathison, G. W.; Okine, E. K.; McAllister, T. A.; Dong, Y.; Galbraith, J.; Dmytruk, O. I. N. (1998). Reducing Methane Emissions from Ruminant Animals. *Journal of Applied Animal Research.* **14**(1), 1–28.
- MAyDS, (2017). Segundo informe bienal de actualización de la república argentina a la convención marco de las naciones unidas sobre el cambio climático. <https://unfccc.int/sites/default/files/resource/2doBUR%20-%20Argentina.pdf>. Visitado 7 de noviembre de 2018.
- McDonald, P.; Edwards, R.A.; Greenhalgh, J.F.D.; Morgan, C.A.; Sinclair, L.A.; Wilkinson, R.G. (2011). *Animal Nutrition* (7 th ed.). Harlow; New York: Prentice Hall/Pearson.
- McDonald, P.; Edwards, R.A.; Greenhalgh, J.F.D.; Morgan, C.A.; Sinclair, L.A.; Wilkinson, R.G. (2014). *Animal Nutrition. Seventh Edition.* <http://gohardanehco.com/wp-content/uploads/2014/02/Animal-Nutrition.pdf>
- Metcalf, J.; Mansbridge, R.; Blake, J.; Oldham, J.; Newbold, J. (2008). The efficiency of conversion of metabolisable protein into milk true protein over a range of metabolisable protein intakes. *Animal.* **2**, 1193–1202.
- Misselbrook, T.H.; Smith, K.A.; Johnson, R.A.; Pain, B.F. (2002). Slurry application techniques to reduce ammonia emissions: Results of some UK field-scale experiments. *Biosyst. Eng.* **81**, 313–321.
- Misselbrook, T.; del Prado, A.; Chadwick, D. (2013). Opportunities for reducing environmental emissions from forage based dairy farms. *Agric. Food Sci.* **22**, 93–107.

- Monteny, G.J.; Erisman, J.W. (1998). Ammonia emission from dairy cow buildings: A review of measurement techniques, influencing factors and possibilities for reduction. *Netherlands Journal of Agricultural Science*. **46**, 225- 247
- Monteny, G.J.; Groenestein, C.M.; Hilhorst, M.A. (2001). Interactions and coupling between emissions of methane and nitrous oxide from animal husbandry. *Nutr. Cycl. Agroecosyst.* **60**, 123–132.
- Monteny, G.J.; Smits, M.C.J.; van Duinkerken, G.; Mollenhorst, H.; de Boer, I.J.M. (2002). Prediction of ammonia emission from dairy barns using feed characteristics Part II: Relation between urinary urea concentration and ammonia emission. *J. Dairy Sci.* **85(12)**, 3389-3394.
- Morrison, M.; Mackie, R.I. (1996). Nitrogen metabolism by ruminal microorganisms: current understanding and future perspectives. *Aust J Agric Res.* **47**, 227–246.
- Morse, D. (1995). Environmental considerations of livestock producers. *J. Animal Sci.* **73**, 2733-2740.
- Mulligan, F.J.; Dillon, P.; Callan, J.J.; Rath, M.; O' mara, F.P. (2004). Supplementary concentrate type affects nitrogen excretion of grazing dairy cows. *J. Dairy Sci.* **87**, 3451–3460.
- Nennich, T.D.; Harrison, J.H.; VanWieringen, L.M.; St-Pierre, N.R.; Kincaid, R.L.; Wattiaux, M.A.; Davidson, D.L.; Block, E. (2006). Prediction and evaluation of urine and urinary nitrogen and mineral excretion from dairy cattle. *J. Dairy Sci.* **89 (1)**, 353–364
- Nevens, F.; Verbruggen, I.; Reheul, D.; Hofman, G. (2006). Farm gate nitrogen surpluses and nitrogen use efficiency of specialized dairy farms in Flanders: evolution and future goals. *Agricultural Systems*. **88**, 142–155.
- Nichols, K.; Bannink, A.; Dijkstra, J. (2019). Energy and nitrogen balance of dairy cattle as affected by provision of different essential amino acid profiles at the same metabolizable protein supply. *J. Dairy Sci.* **102**, 10.
- Nicholson, F.; Groves, S.; Chambers, B. (2005). Pathogen survival during livestock storage and following land application. *Bioresour. Technol.* **96(2)**, 135-143.
- Niu, M.; Appuhamy, J.A.D.R.N.A; Leytem, A.B.; Dungan, R.S.; Kebreab, E. (2016). Effect of dietary crude protein and forage contents on enteric methane emissions and nitrogen

excretion from dairy cows simultaneously. *Anim. Prod. Sci.* **56**, 312–321.

Nocek, J.E.; Russell, J.B. (1988). Protein and energy as an integrated system. Relationship of ruminal protein and carbohydrate availability to microbial synthesis and milk production. *J. Dairy Sci.* **71**, 2070-2107.

Nosetti, L.; Herrero, M.A.; Pol, M.; Maldonado, V.; Iramain, M.S. (2002). Cuantificación y caracterización de agua y efluentes en establecimientos lecheros; I. Demanda de agua y manejo de fluentes. *Rev. InVet.* **4(1)**, 37-43.

Nousiainen, J.; Shingfield, K.J.; Huhtanen, P. (2004). Evaluation of milk urea concentration as a diagnostic of protein feeding. *J. Dairy Sci.* **87**, 386–398.

NRC. (2001). Nutrient Requirements of Dairy Cattle. 7th rev. ed. Natl. Acad. Sci., Washington, D.C.

O'mara, F.P. (2011). The significance of livestock as a contributor to global greenhouse gas emissions today and in the near future. *Animal Feed Science and Technology.* **166-167**, 7-15.

OCDE, 2018. Trade and the Environment: The Dairy Sector. <https://www.oecd.org/tad/sustainable-agriculture/33798326.pdf>. Visitado 16 de diciembre 2018.

OCDE-FAO, (2017). Perspectivas Agrícolas 2017-2026 <http://www.fao.org/3/a-BT090s.pdf>. Visitado 16 de diciembre 2018

OCLA, (2018). Observatorio de la Cadena Láctea Argentina <http://www.ocla.org.ar/>. Visitado 16 de diciembre 2018.

Oenema, O.; Kros, H.; de Vries, W., (2003). Approaches and uncertainties in nutrient budgets: implications for nutrient management and environmental policies. *Eur. J. Agron.* **20**, 3–16.

Oenema, O.; Witzke, H.P.; Klimont, Z.; Lesschen, J.P.; Velthof, G.L. (2009). Integrated assessment of promising measures to decrease nitrogen losses from agriculture in EU-27. *Agric. Ecosyst. Environ.* **133**, 280–288.

Ørskov, E.R. (1992). Protein Nutrition in Ruminants. 2nd ed. Academic Press, Inc., San Diego,

CA.

- Ørskov, E.R.; MacLeod, N.A. (1982). Validation and application of new principles of protein evaluation for ruminants. Pages 76-85 in Protein contribution of feedstuffs for ruminants. E. L. Miller, I. H. Pike, and A.J.H. van Es., ed. Butterworths, London.
- Ouellet, D.R.; Demers, M.; Zuur, G.; Lobley, G.E.; Seoane, J.R.; Nolan, J.V.; Lapierre, H. (2002). Effect of dietary fiber on endogenous nitrogen flows in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* **85(11)**, 3013-3025.
- Owens, F. (2014). Protein Nutrition of Dairy Cattle – An Overview. <http://dairy.ifas.ufl.edu/rns/2014/owens.pdf> 25th Symposium. **515**, 53-77.
- Pacheco, D.; Burke, J.L.; Death, A.F.; Cosgrove, G.P. (2007). Comparison of models for estimation of urinary nitrogen excretion from dairy cows fed fresh forages. In: Meeting the Challenges for Pasture-Based Dairying. Proceedings of the 3rd Australasian Dairy Science Symposium, pp. 417-422.
- Pacheco, D.; Lowe, K.; Hickey, M.J.; Burke, J.L.; Cosgrove, G.P. (2010). Seasonal and dietary effects on the concentration of urinary N from grazing dairy cows. In: Meeting the Challenges for Pasture-Based Dairying. Lincoln University, Christchurch, New Zealand. Proceedings of the 4th Australasian Dairy Science Symposium, pp. 68-73.
- Panigatti, M.C.; Boglione, R.; Griffa, C.; Cassina, D.; Schierano, M.C.; Imoberdof, M. (2010). Influencia de los predios lecheros en la calidad de las aguas subterráneas freáticas. Estudio de casos en tambos de la provincia de Santa Fe, Argentina.
- Patton, R.A.; Hristov, A.N.; Lapierre, H. (2014). Protein Feeding and Balancing for Amino Acids in Lactating Dairy Cattle. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* **30 (3)**, 599-621.
- Peyraud, J.L.; Astigarraga, L. (1998). Review of the effect of nitrogen fertilisation on the chemical composition, intake, digestion and nutritive value of fresh herbage: Consequences on animal nutrition and N balance. *Anim. Feed Sci. Technol.* **72**, 235–259.
- Pinares-Patiño, C.S.; Waghorn, G.C.; Hegarty, R.S.; Hoskin, S.O. (2009). Effects of intensification of pastoral farming on greenhouse gas emissions in New Zealand. *N. Z. Vet. J.* **57**, 252–261.
- Pinder, R.W.; Strader, R.; Davidson, C.I.; Adams, P.J. (2004). A temporally and spatially resolved

- ammonia emission inventory for dairy cows in the United States. *Atmos. Environ.* **38**, 3747–3756.
- Pisulewski, P.M.; Okorie, A.U.; Buttery, P.J.; Haresign, W. Lewis; D. (1981). Ammonia concentration and protein synthesis in the rumen. *J. Sci. Food Agric.* **32**, 759.
- Posada S.L.; Noguera, R.R.; Rodríguez, N.M.; Borges, A.L. (2012). Creatinine used as an indicator of urinary excretion in Nelore cattle. *Rev Colomb Cienc Pecu.* **25**, 56-63.
- Powell, J.M.; Barros, T.; Danesc, M.; Aguerre, M.; Wattiaux, M.; Reed, K. (2017). Nitrogen use efficiencies to grow, feed, and recycle manure from the major diet components fed to dairy cows in the USA. *Agriculture, Ecosystems and Environment.* **239**, 274–282
- Powell, J.M.; Jackson-Smith, D.B.; McCrory, D.F.; Saam, H.; Mariola, M. (2007). Nutrient management behavior on Wisconsin dairy farms. *Agron. J.* **99**, 211–219.
- Powell, J.M.; Li, Y.; Wu, Z.; Broderick, G.A.; Holmes, B.J. (2008). Rapid assessment of feed and manure management on dairy farms. *Nutr. Cycl. Agroecosyst.* **82**, 107–115.
- Powell, J.M.; Broderick, G.A.; Grabber, J.H.; Hymes-Fecht, U.C. (2009). Effects of forage protein-binding polyphenols on chemistry of dairy excreta. *J. Dairy Sci.* **92**, 1765–1769
- Powell, J.M.; Gourley, C.J.P.; Rotz, C.A.; Weaver, D.M. (2010). Nitrogen use efficiency: a measurable performance indicator for dairy farms. *Environ. Sci. Policy.* **13**, 217–228.
- Powell, J.M.; Macleod, M.; Vellinga, T.V.; Opio, C.; Falcucci, A; Tempio, G.; Steinfeld, H.; Gerber, P. (2013). Feed–milk–manure nitrogen relationships in global dairy production systems. *Livestock Science.* **152**, 261–272.
- Powell, J.M.; Rotz, C.A. (2015). Measures of Nitrogen Use Efficiency and Nitrogen Loss from Dairy Production Systems. *J. Environ. Qual.* **44**, 336–344.
- Powell, J.M.; Rotz, C.A.; Vadas, P.A.; Kristan, F. (2016). Reed Substitutions of corn silage, alfalfa silage and corn grain in cow rations impact N use and N loss from dairy farms. Proceedings of the 2016 International Nitrogen Initiative Conference, "Solutions to improve nitrogen use efficiency for the world". [http://www.ini2016.com/pdf-papers/INI2016\\_Powell\\_Mark.pdf](http://www.ini2016.com/pdf-papers/INI2016_Powell_Mark.pdf)
- Powers, W.J.; van horn, H.H.; Harris Jr., B.; Wilcox C.J. (1995). Effects of variable sources of

distillers dried grains plus solubles on milk yield and composition. *J. Dairy Sci.* **78(2)**, 388-396.

Qiu, S.; Ju, X.; Ingwersen, J.; Qin, Z.; Li, L.; Streck, T.; Christie, P.; Zhang, F. (2010). Changes in soil carbon and nitrogen pools after shifting from conventional cereal to greenhouse vegetable production. *Soil Tillage Res.* **107**, 80–87.

Raggio, G.; Pacheco, D.; Berthiaume, R.; Lobley, G.E.; Pellerin, D.; Allard, G.; Dubreuil, P.; Lapierre, H. (2004). Effect of level of metabolizable protein on splanchnic flux of amino acids in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* **87(10)**, 3461-3472.

Räisänen, S. (2016). Milk production and protein utilization in high producing dairy cows fed a low CP diet based on cereals and roughage only: a full lactation study. Second cycle, A2E. <http://urn.kb.se/resolve?urn=urn:nbn:se:slu:epsilon-s-5581>

Recktenwald, E.B.; Ross, D.A.; Fessenden, S.W.; Wall, C.J.; Van Amburgh, M.E. (2014). Urea-N recycling in lactating dairy cows fed diets with 2 different levels of dietary crude protein and starch with or without monensin. *J. Dairy Sci.* **97**, 1611–1622.

Reijs, J.W.; Sonneveld, M.P.W.; Sørensen, P.; Schils, R.L.M.; Groot, J.C.J.; Lantinga, E.A. 2007. Effects of different diets on utilization of nitrogen from cattle slurry applied to grassland on a sandy soil in The Netherlands. *Agr. Ecosyst. Environ.* **118**, 65-79.

Rennó, L.N.; Valadares Filho, S.C.; Paulino, M.F.; Leão, M.I.; Valadares, R.F.D.; Rennó, F.P. (2008). Níveis de uréia na ração de novilhos de quatro grupos genéticos: parâmetros ruminais, uréia plasmática e excreções de uréia e creatinina. *Rev Bras Zootec.* **37**,556-562.

Reynal, S.M.; Broderick, G.A. (2005).Effect of dietary level of rumen-degraded protein on production and nitrogen metabolism in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* **88**, 4045–4064.

Reynolds, C.K.; Kristensen, N.B. (2008). Nitrogen recycling through the gut and the nitrogen economy of ruminants: an asynchronous symbiosis. *J. Animal Sci.* **86 (E)**, 293–305.

Rodríguez, A.G.; Yañez, O.V. (2000). El análisis de urea en leche como indicador del balance nutritivo de la alimentación de las vacas. <http://www.laboratoriollamas.com.ar/articulos/bovinos/Urea%20en%20Leche%20como%20indicador%20de%20nutricion.pdf>

- Romagnolo, L.C.; Polan, C.E.; Barbeau, W.E. (1994). Electrophoretic analysis of ruminal degradability of corn proteins. *J. Dairy Sci.* **77**, 1093–1099.
- Rotz, C.A. (2004). Management to reduce nitrogen losses in animal production. *J. Anim. Sci.* **82**, 119-137.
- Ruddy, B.C.; Lorenz, D.L.; Mueller, D.K. (2006). County-level estimates of nutrient inputs to the land surface of the conterminous United States, 1982–2001: U.S. Geological Survey Scientific Investigations Report 2006-5012. [https://pubs.usgs.gov/sir/2006/5012/pdf/sir2006\\_5012.pdf](https://pubs.usgs.gov/sir/2006/5012/pdf/sir2006_5012.pdf)
- Ruiz, R.; Tedeschi, L.O.; Marini, J.C.; Fox, D.G.; Pell, A.N.; Jarvis, G.; Russell, J.B. (2002). The effect of a ruminal nitrogen (N) deficiency in dairy cows: Evaluation of the Cornell Net Carbohydrate and Protein Systems ruminal N deficiency adjustment. *J. Dairy Sci.* **85**, 2986–2999.
- Ryan, W.; Hennessy, D.; Murphy, J.J.; Boland, T.M.; Shalloo, L. (2011). A model of nitrogen efficiency in contrasting grass-based dairy systems. *J. Dairy Sci.* **94**, 1032–1044.
- SAGPyA, (2018). Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca. <https://www.argentina.gob.ar/agroindustria/agricultura-ganaderia-y-pesca>. Visitado 16 de diciembre 2018
- Sairanen, A.; Khalili, H.; Nousiainen, J.I.; Ahvenjärvi, S.; Huhtanen, P. (2005). The effect of concentrate supplementation on nutrient flow to the omasum in dairy cows receiving freshly cut grass. *J. Dairy Sci.* **88**, 1443–1453.
- Säll, S.; Gren, I.M. (2015). Effects of an environmental tax on meat and dairy consumption in Sweden. *Food Policy.* **55**, 41–53.
- Sanchez, C.; Suero, M.; Castignani, H.; Terán, J.C.; Marino, M. (2012). La lechería argentina: estado actual y su evolución (2008 a 2011). Asociación Argentina de Economía Agraria. Trabajo presentado en el marco del Proyecto Específico “Gestión de la Información y Modelización en Lechería Bovina (52071092). PAN Leches. INTA.
- Santos, F. A. P.; Santos, J. E. P. Theurer, C. B. Huber. J. T. (1998). Effects of ruminant-undegradable protein on dairy cow performance: A 12-year literature review. *J. Dairy Sci.* **81**, 3182–3213.

- Sarraseca, A.; Milne, E.; Metcalf, M.J.; Lobley, G.E. (1998). Urea recycling in sheep: Effects of intake. *Br. J. Nutr.* **79**, 79–88.
- Sauvant, D.; Van Milgen, J. (1995). Dynamic aspects of carbohydrates and protein breakdown and the associated microbial matter synthesis. In: W. v. Engelhardt, S. Leonhard-Marek, G. Breves, and D. Giesecke, editors, *Ruminant physiology: Digestion, metabolism, growth and reproduction*. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, Germany. 71–91.
- Sauvant, D.; Giger-Reverdin, S. (2009). Modélisation des interactions digestives et de la production de méthane chez les ruminants. *INRA Prod. Anim.* **22**, 375–384.
- Selbie, D.R.; Buckthought, L.E.; Shepherd, M.A. (2015). “The challenge of the urine patch for managing nitrogen in grazed pasture systems,” in *Advances in Agronomy*, Vol. 129, ed D. L Sparks (London: Academic Press), 229–292.
- Silva, R.M.N.; Valadares, R.F.D.; Valadares Filho, S.C.; Cecon, P.R.; Rennó, L.N.; Silva, J.M. (2001). Uréia para Vacas em Lactação. 2. Estimativas do Volume Urinário, da Produção Microbiana e da Excreção de Uréia. *Rev Bras Zootec.* **30**, 1948-1957.
- Sinclair, K.D.; Garnsworthy, P.C.; Mann, G.E.; Sinclair, L.A. (2014). Reducir la proteína de la dieta en las dietas de vacas lecheras: implicaciones para la utilización del nitrógeno, la producción de leche, el bienestar y la fertilidad. *Animal.* **8** (2), 262-274.
- Sinclair, L.A.; Garnsworthy, P.C.; Newbold, J.R.; Buttery, P.J. (1993). Effect of synchronizing the rate of dietary energy and nitrogen release on rumen fermentation and microbial protein-synthesis in sheep. *Journal of Agricultural Science.* **120**, 251-263.
- Smits, M.C.J.; Valk, H.; Elzing, A.; Keen, A. (1995). Effect of protein nutrition on ammonia emission from a cubicle house for dairy cattle. *Livest. Prod. Sci.* **44**, 147–156.
- Sniffen, C.J.; Robinson, P.H. (1987). Microbial growth and flow as influenced by dietary manipulations. *J. Dairy Sci.* **70**, 425-441.
- Sørensen, P.; Weisbjerg, M.R.; Lund, P. (2003). Dietary effects on the composition and plant utilization of nitrogen in dairy cattle manure. *J. Agric. Sci.* **141**, 79–91.
- Spek, J.; Bannink, A.; Gort, G.; Hendriks, W.; Dijkstra, J. (2013). Interaction between dietary content of protein and sodium chloride on milk urea concentration, urinary urea excretion,

renal recycling of urea, and urea transfer to the gastrointestinal tract in dairy cows. *J. Dairy Sci.* **96**, 5734–5745.

Staerfl, S.M.; Amelchanka, S.L.; Kälber, T.; Soliva, C.R.; Kreuzer, M.; Zeitz, J.O. (2012). Effect of feeding dried high-sugar ryegrass ('AberMagic') on methane and urinary nitrogen emissions of primiparous cows. *Livest. Sci.* **150**, 293–301.

Steinfeld, H.; Gerber, P.; Wassenaar, T.; Castel, V.; Rosales, M.; Haan, C.D. (2006). *Livestock's Long Shadow - Environmental Issues and Options*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.

Sutter, F.; Schwarmb, A.; Kreuzerb, M. (2017). Development of nitrogen and methane losses in the first eight weeks of lactation in Holstein cows subjected to deficiency of utilisable crude protein under restrictive feeding conditions. *Arch.of Anim. Nutrition*, **71** (1), 1–20.

Tamminga, S. (1979). Protein degradation in the forestomachs of ruminants. *J. Anim. Sci.* **49**, 1615.

Tamminga, S. (1992). Nutrition management of dairy cows as a contribution to pollution control. *J. Dairy Sci.* **75**, 345–357.

Tamminga, S. (1996). A review on environmental impacts of nutritional strategies in ruminants. *J Anim. Sci*, **74**, 3112-3124.

Tas, B.M.; Susenbeth, A. (2007). Urinary purine derivatives excretion as an indicator of in vivo microbial N flow in cattle: A review. *Livestock Science*. **111**, 181–192.

Taverna, M.; Charlón, V.; Panigatti, C.; Castillo, A.; Serrano, P.; Giordano, J. (2004). Manejo de los residuos originados en las instalaciones de ordeño. (Ed.) INTA, Rafaela, Argentina. Pp 75.

Taverna, M.; Ghiano, J.; Gastaldi, L.; Walter, E. (2012). El agua de bebida. Punto clave para limitar el estrés calórico. INTA Lechero.

Taweel, H.Z.; Tas, B.M.; Smit, H.J.; Elgersma, A.; Dijkstra, J.; Tamminga, S. (2006). Grazing behaviour, intake, rumen function and milk production of dairy cows offered *Lolium perenne* containing different levels of water-soluble carbohydrates. *Livestock Science* **102**, 33 – 41

- Tebbe A.W.; Weiss, W.P. (2018). Evaluation of creatinine as a urine marker and factors affecting urinary excretion of magnesium by dairy cows. *J. Dairy Sci.* **101**, 1–13.
- Tebot, I.; Britos, A.; Godeau, J.M.; Cirio, A. (2002). Microbial protein production determined by urinary allantoin and renal urea sparing in normal and low protein fed Corriedale sheep. *Veterinary Research.* **33**(1), 101-106.
- Thomassen, M.A.; De Boer, I.J.M. (2005). Evaluation of indicators to assess the environmental impact of dairy production systems. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, **111**, 185-199.
- Tieri, M.P.; Faverin, C.; Charlón, V.; Comerón, E.A.; Gonda, H.L. (2017a). Analysis of different productive strategies on greenhouse gases emissions in Argentinian dairy production systems. En 54<sup>a</sup> Reunión Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia.
- Tieri, M.P.; Faverin, C.; Charlón, V.; Comerón, E.A.; Gonda, H.L. (2017b). Eficiencia de uso del nitrógeno dietario y emisión de metano en vacas en ordeño en tambos de la Argentina. *Rev. Arg. Prod. Anim.* **37** (1), pp 219.
- Tomlinson, A.P.; Powers, W.J.; Van Horn, H.H.; Nordstedt, R.A.; Wilcox, C.J. (1996). Dietary protein effects on nitrogen excretion and manure characteristics of lactating cows. *Trans. Am. Soc. Agric. Eng.* **39**, 1441–1448.
- Tylutki, T. P.; Fox, D.G.; McMahon, M. (2004). Implementation of nutrient management planning on a dairy farm. *The Professional Animal Scientist.* **20**, 58-65.
- Ulyatt, M.J. (1997). Can protein utilisation from pasture be improved? *Proceeding of the New Zealand Society of Animal Production.* **57**, 4-8.
- Ussiri, D.; Lal, R. (2013). Soil emission of nitrous oxide and its mitigation. Springer, Dordrecht, 378.
- Valadares, R.F.D.; Broderick, G.A.; Valadares Filho, S.C.; Clayton, M.K. (1999). Effect of replacing alfalfa silage with high moisture corn on ruminal protein synthesis estimated from excretion of total purine derivatives. *J. Dairy Sci.* **82**, 2686–2696.
- Van Amburgh, M. E.; Capper, J.L.; Bauman, D.E. (2008). A perspective on the environmental impact of the dairy industry - Issues and progress. Pages 25-32 in Northeast Dairy Producers Conference, Liverpool, NY.

- Van de Haar, M.J.; St-Pierre, N.R. (2006). Major Advances in Nutrition: Relevance to the Sustainability of the Dairy Industry. *J. Dairy Sci.* **89**(4), 1280-1291.
- van Duinkerken, G. (2011). Nitrogen efficiency of dairy cattle from protein evaluation to ammonia emission. Thesis. <http://edepot.wur.nl/177050>
- Van Gastelen, S.; Antunes-Fernandes, E.C.; Hettinga, K.A.; Klop, G.; Alferink, S.J.J.; Hendriks, W.H.(2015). Enteric methane production, rumen volatile fatty acid concentrations, and milk fatty acid composition in lactating Holstein-Friesian cows fed grass silage- or corn silage-based diets. *J. Dairy Sci.* **98**, 1915–1927.
- Vankeirsbilck, M.I.; Sardi, G.; Diez, M.; Herrero, M.A.; Maekawa, M. (2016). Análisis de la percepción ambiental en contaminación de agua y manejo de efluentes para generar propuestas de capacitación para productores y asesores del sector lechero. VI Congreso Nacional y V Congreso Internacional de Enseñanza en las Ciencias Agropecuarias. Buenos Aires, Argentina. [https://inta.gob.ar/sites/default/files/inta\\_mt2016\\_vankeirsbilck\\_percepcion\\_ambiental\\_1.pdf](https://inta.gob.ar/sites/default/files/inta_mt2016_vankeirsbilck_percepcion_ambiental_1.pdf)
- Wang, J.; Ye, J.; Liu, L. (2012). Effects of tea saponins on rumen microbiota, rumen fermentation, methane production and growth performance—A review. *Trop. Anim. Health Prod.* **44**, 697–706.
- Warner, D.; Hatew, B.; Podesta, S. C.; Klop, G.; van Gastelen, S.; van Laar, H. (2016). Effects of nitrogen fertilisation rate and maturity of grass silage on methane emission by lactating dairy cows. *Animal*. **10**, 34–43.
- Wattiaux, M.; Karg, K. (2004). Protein level for alfalfa and corn silage-based diets: II. Nitrogen balance and manure characteristics. *J. Dairy Sci.* **87**, 3492-3502.
- Wheadon, N.M.; McGee, M.; Edwards, G.R. Dewhurst; R.J. (2014). Plasma nitrogen isotopic fractionation and feed efficiency in growing beef heifers. *Br. J. Nutr.* **111**, 1705–1711.
- Whitehead, D.C. (1995). Grassland Nitrogen. CAB International, Wallingford, UK.
- Wickersham, T.A.; Titgemeyer, E.C.; Cochran, R.C.; Wickersham, E.E.; Gnad, D.P. (2008). Effect of rumen-degradable intake protein supplementation on urea kinetics and microbial

- use of recycled urea in steers consuming low-quality forage. *J. Anim. Sci.* **86**, 3079-3088
- Wilkinson, J.M. (2011). Redefining efficiency of feed use by livestock. *Animal*. **5**, 1014-1022.
- Wilkinson, J.M.; Garnsworthy, P.C. (2017). Impact of diet and fertility on greenhouse gas emissions and nitrogen efficiency of milk production. *Livestock*, **22 (3)**, 140-144.
- Wu, Z.; Massingill, L.J.; Walgenbach, R.P.; Satter, L.D. (2001). Cracked dry or finely ground high moisture shelled corn as a supplement for grazing cows. *J. Dairy Sci.* **84**, 2227– 2230.
- Wu, Z.; Satter, L.D. (2000). Milk Production During the Complete Lactation of Dairy Cows Fed Diets Containing Different Amounts of Protein. *J. Dairy Sci.* **83**, 1042–1051.
- Yan, T.; Mayne, C.S.; Gordon, F.G.; Porter, M.G.; Agnew, R.E.; Patterson, D.C.; Ferris, C.P.; Kilpatrick, D.J. (2010). Mitigation of enteric methane emissions through improving efficiency of energy utilization and productivity in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* **93**, 2630–2638.
- Zhai, S.; Liu, J.; Wu, Y.; Ye, J. (2007). Predicting urinary nitrogen excretion by milk urea nitrogen in lactating Chinese Holstein cows. *Anim. Sci. J.* **78**, 395–399.

## **CAPÍTULO 3 – REVISIÓN SISTEMÁTICA: Consumo de proteína en vacas lecheras y su efecto sobre la producción de leche, la eficiencia en el uso del nitrógeno y la emisión de metano entérico.**

### **3.1. INTRODUCCIÓN**

La eficiencia alimenticia en la producción lechera ha recibido cada vez mayor atención, debido a su influencia no solo en la rentabilidad del sistema, sino también en las pérdidas de nitrógeno (N) al ambiente. La determinación adecuada de los requerimientos proteicos es uno de los factores críticos en la nutrición de las vacas lecheras para lograr maximizar la producción minimizando el consumo de proteínas y la eliminación de N por medio de las excretas (Lee *et al.*, 2011). Además de las cuestiones productivas, la comprensión de las interrelaciones que existen con la regulación de N es necesaria para facilitar el desarrollo de estrategias nutricionales que mejoren la utilización de N y reduzcan la excreción de N (Higgs, 2009).

En el capítulo anterior se concluyó que los niveles de PB de las dietas entregadas a vacas en ordeño en nuestro país fueron superiores a aquellos niveles recomendados a nivel internacional y esto generó que los valores de EUN fueran menores a las deseadas. El aumento de la presión pública en favor de una producción animal sostenible exige un nuevo análisis de los factores que son esenciales para optimizar EUN y así disminuir la cantidad de N eliminado al ambiente. En la ganadería, la necesidad de entender las complejas relaciones biológicas, ambientales y de gestión está aumentando (St-Pierre, 2001).

Históricamente, al efecto del tratamiento se lo considera un efecto fijo, no porque realmente lo sea, sino a nuestra incapacidad para resolver eficientemente modelos mixtos de tamaño modesto (aquellos que contienen tanto efectos fijos como aleatorios). Sin embargo, los softwares estadísticos modernos han superado esta limitación. Consecuentemente, los meta-análisis actuales posibilitan la incorporación el efecto tratamiento y sus efectos de interacción como componentes aleatorios de un modelo mixto. Esto posibilita mejores ecuaciones de predicción de los sistemas biológicos y una descripción más precisa de sus errores de predicción (St-Pierre, 2001).

El objetivo del presente capítulo fue estudiar la relación entre el consumo de N, la producción de leche, la excreción de N en leche, en orina y en heces, el N retenido, la EUN y el NUL a partir de una revisión sistemática, para un conocimiento integral de las mismas y ayudar a definir los niveles utilizados en el ensayo a campo. En consecuencia, en el presente estudio se reunieron los

datos de 53 ensayos con vacas lecheras que incluyeron dietas con diferentes niveles de PB.

## 3.2. MATERIALES Y METODOS

Se evaluaron los resultados obtenidos en dietas de 53 ensayos de alimentación publicados que tenían como objetivo evaluar diferentes concentraciones de proteína en la dieta de vacas lecheras, representando un total de 222 tratamientos y 2158 vacas (Piepenbrink *et al.*, 1996; Metcalf *et al.*, 1996; Cunningham *et al.*, 1996; Kalscheur *et al.*, 1999; Wu y Satter, 2000; Bach *et al.*, 2000; Schor y Gagliostro, 2001; M'hamed *et al.*, 2001; Castillo *et al.*, 2001; Ruiz *et al.*, 2002; Kokkonen *et al.*, 2002; Frank y Swensson, 2002; Davidson *et al.*, 2003; Broderick., 2003; Hristov *et al.*, 2004; Raggio *et al.*, 2004; Reynal y Broderick, 2005; Groff y Wu, 2005; Ipharraguerre *et al.*, 2005; Kalscheur *et al.*, 2006; Colmenero y Broderick, 2006; van Dorland *et al.*, 2007; Metcalf *et al.*, 2008; Broderick *et al.*, 2008; Imaizumi *et al.*, 2010; Aguerre *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2011; Staerfl *et al.*, 2012; Hassanat *et al.*, 2013; Spek *et al.*, 2013; Cantalapiedra-Hijar *et al.*, 2014; Doreau *et al.*, 2014; Arriola Apelo *et al.*, 2014; Fanchone *et al.*, 2014; Recktenwald *et al.*, 2014; Neal *et al.*, 2014; Reid *et al.*, 2015; Rinne *et al.*, 2015; Broderick *et al.*, 2015; Arndt *et al.*, 2015; Edouard *et al.*, 2016; Mohtashami *et al.*, 2016; Hynes *et al.*, 2016; Mutsvangwa *et al.*, 2016; Niu *et al.*, 2016; Sutter *et al.*, 2017; Barros *et al.*, 2017; Kauffman *et al.*, 2017; Corea *et al.*, 2017; Savari *et al.*, 2018; Ebrahimi *et al.*, 2018; Chen *et al.*, 2018). Estos ensayos incluyeron estudios de alimentación a largo plazo y estudios en los que las dietas se rotaron entre las vacas a lo largo del tiempo en diseños crossover o de cuadrado latino. Aunque el CMS y la producción de leche se informaron para las vacas en todos los ensayos incluidos, sólo se informaron otras mediciones (digestibilidad aparente, excreción de N urinario y fecal, retención de N (balance de N), componentes de la leche, N ureico en leche (NUL) y N ureico en sangre (NUS) en algunos de los ensayos.

Lo primero que se realizó fue un análisis de componentes principales para evaluar las relaciones de las variables bajo estudio: consumo de N, producción de leche (PL, kg), excreción de N en leche, en orina y en heces, N retenido, EUN y NUL.

A continuación, se realizó una caracterización de variables productivas y de emisión de CH<sub>4</sub> en las diferentes dietas entregadas, para luego realizar un análisis de conglomerados usando una matriz de datos estandarizada, el método de agrupamiento de Ward y distancia Euclídea en función de los días en lactancia (DEL), el nivel de PB en la dieta, la producción de leche y la EUN, con el objetivo de determinar la existencia de grupos de tratamientos con comportamiento similar en base

a las variables evaluadas. Para confirmar las diferencias entre los grupos se utilizó el test de Kruskal-Wallis.

Posteriormente, a fin de determinar la función que relaciona la concentración de PB (%) y algunas de las variables productivas, se realizó un análisis a través de regresiones aleatorias. El mismo contempló la incorporación del efecto “estudio”, referido a cada ensayo con diferentes tratamientos, como un factor aleatorio, el cual se testeó para incorporarlo a la pendiente y la ordenada (St-Pierre, 2001). A través de pruebas chi cuadrado para la diferencia de log-likelihoods se evaluó la significancia de los efectos fijos y aleatorio sobre la ordenada al origen y la pendiente mediante los diferentes modelos de regresiones previamente desarrollados.

Para desarrollar la predicción de producción de leche (PL), contenido proteico de la leche, consumo de materia seca (CMS), eficiencia en el uso del N (EUN) y N ureico en leche (NUL) se utilizó el siguiente modelo:

$$y_{ij} = \beta_{0i} + \beta_{1i} * x_{1i} + e_{ij}$$

Donde:  $y_{ij}$  corresponde a la variable respuesta observada en el estudio  $i$  – ésimo ( $i=1$  a  $53$ ) de la observación  $j$  – ésima del estudio ( $j=1$  a  $n_i$  dependiendo del estudio).

$\beta_{0i}$  es la ordenada al origen la cual se define como:

$$\beta_{0i} = \gamma_{00} + \mu_{0i}$$

Donde:  $\gamma_{00}$  es la ordenada general,  $\mu_{0i}$  es el efecto aleatorio del estudio  $i$  – ésimo sobre la ordenada al origen y  $\beta_{1i}$  es la pendiente de la recta, la cual se define como:

$$\beta_{1i} = \gamma_{10} + \mu_{1i}$$

Donde:  $\gamma_{10}$  es la pendiente general y  $\mu_{1i}$  es el efecto aleatorio del estudio  $i$  – ésimo sobre la pendiente de la recta de regresión.

Tanto  $\mu_{0i}$  como  $\mu_{1i}$  se distribuyen normal con media igual a cero y varianza  $\sigma_{\mu_0}^2$  y  $\sigma_{\mu_1}^2$

$e_{ij}$  es el término de error.

Para las distintas evaluaciones se utilizó el paquete estadístico R Core Team (2016).

### 3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 3.1 se pueden observar los valores medios, desvíos estándar, máximos y mínimos de las principales variables presentes en la base de datos de los ensayos de alimentación publicados y que representaron un total de 222 tratamientos. El conjunto de datos incluía dietas que variaban ampliamente en la relación forraje/concentrado (promedio 57,5: 42,3; extremos: 18,7:81,3 y

90,5:9,5).

El silaje de maíz, silaje de alfalfa y heno fueron los componentes forrajeros predominantes de las dietas, representando el  $46,8 \pm 14,3\%$  de la dieta para el caso de los silajes y el  $15,3 \pm 12,2\%$  de la dieta el heno. Los granos de maíz, cebada y trigo fueron los principales concentrados energéticos utilizados, representando el  $26,7 \pm 9,5 \%$  de la MS de las dietas y los principales suplementos proteicos fueron la harina de soja extraída con y la harina de colza, representando el  $10,0 \pm 5,5 \%$  de la MS total entregada sólo 10 tratamientos fueron evaluados bajo condiciones de pastoreo, representando en aquellos casos en promedio el  $62,0 \pm 34,4 \%$  de la MS consumida.

Del total de los tratamientos, el 99,1 % correspondieron a dietas entregadas a vacas Holstein. Además, DEL al inicio de estos ensayos oscilaron entre 15 y 273 días, con una media de 85 días, y el 31% de los tratamientos fue aplicado a vacas previo a los 60 DEL, 59,0% en inicio de lactancia, 33,0% media lactancia y 9,0% a vacas con más de 200 DEL.

Según Hristov y Giallongo (2014), las dietas con una concentración de PB del 16% o menos son frecuentes en las lecherías comerciales de algunos países. Sin embargo, los esfuerzos de investigación en los últimos años se han centrado en valores “óptimos” para un balance entre la producción de leche y excreción de N, cercanos al 16% de PB. Las concentraciones de proteína de la dieta en las dietas comerciales típicamente son mayores para las vacas al principio que al final de la lactancia, cuando la fuente de forraje es alfalfa en lugar de ensilado de maíz, y cuando las fuentes suplementarias de proteína tienen un bajo costo, según Owens (2014). Por el contrario, la preocupación por el manejo y la eliminación de las excretas, a menudo lleva a los productores a reducir el contenido proteico de sus dietas y a cambiar a fuentes de proteínas con un alto contenido de AA esenciales o que resisten la degradación ruminal.

En el caso de los ensayos realizados previos al pico, los valores de proteína utilizados en las dietas variaron entre 11,3 y 28,2% ( $16,7 \pm 2,7\%$ ), permitiendo valores de EUN en promedio de  $30,6 \pm 7,1\%$ . Sin embargo, el 50% de los tratamientos estuvieron en el rango de 25,8 a 33,1 %. Para el caso de vacas con más de 60 DEL y menos de 100 DEL, el nivel de PB promedio utilizado fue de  $16,0 \pm 1,6\%$ , evaluándose solamente tres tratamientos con niveles inferiores al 14% (Raggio *et al.*, 2004; Fanchone *et al.*, 2014) y cuatro tratamientos con niveles por encima del 18% (Reynal y Broderick, 2005; Groff y Wu, 2005; Arndt *et al.*, 2015), siendo 18,8% PB el máximo nivel evaluado.

Las EUN observadas rondaron el  $28,2 \pm 3,1\%$ . Aquellas dietas entregadas a vacas en lactancia

media (100 a 200 DEL) contaron con niveles de PB de  $16,4 \pm 2,4\%$ , con un mínimo de 11,4 y un máximo de 25,5, y obtuvieron EUN en torno al  $28,3 \pm 4,3\%$ . Por último, para el caso de las vacas con más de 200 DEL, los niveles promedios de PB utilizados fueron menores al resto de las etapas ( $13,9 \pm 2,4$ ) al igual que las EUN observadas ( $25,7 \pm 4,6\%$ ).

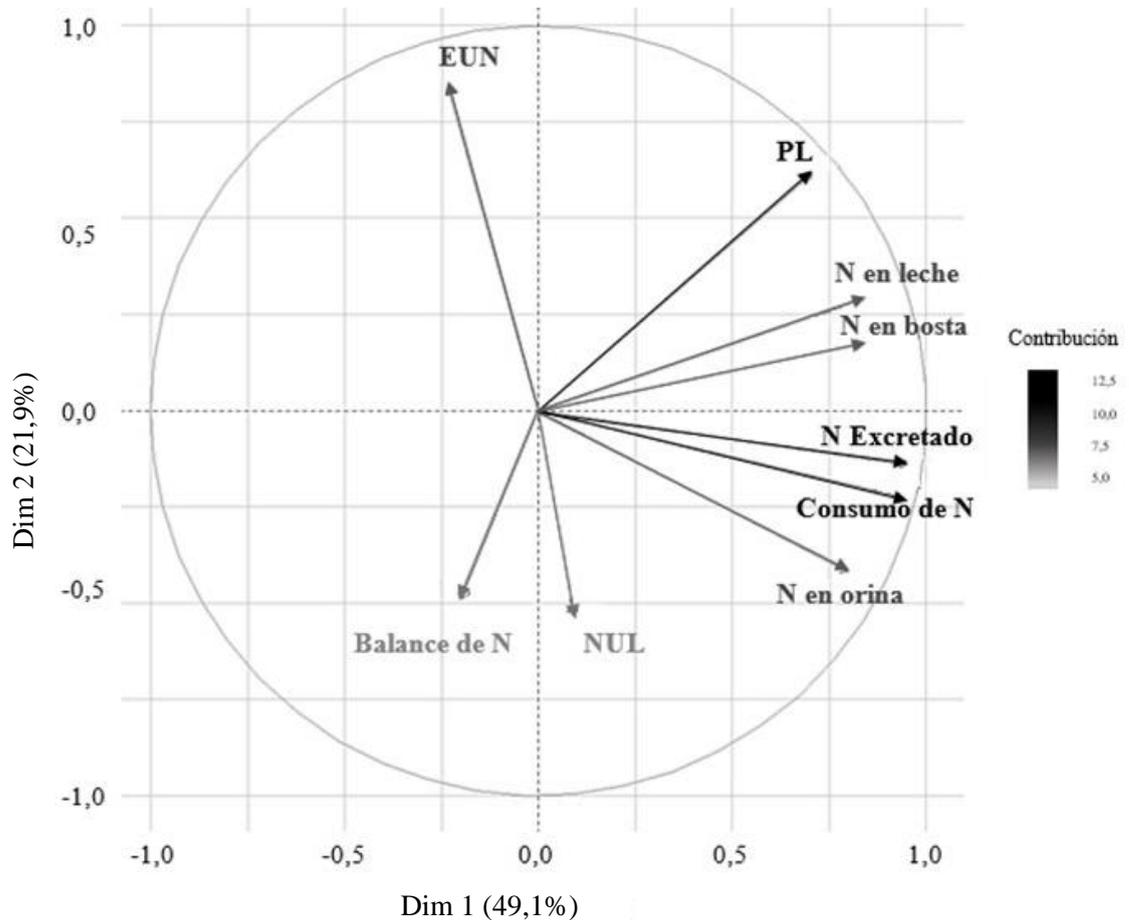
**Tabla 3.1:** Caracterización de variables productivas y de emisión de metano en 222 dietas evaluadas en 53 ensayos y 222 dietas con diferente contenido de PB de la dieta entregada a vacas en lactancia.

<b>VARIABLES</b>	<b>Medía</b>	<b>DE</b>	<b>Mín.</b>	<b>Máx.</b>
Peso vivo, kg	621,0	72,2	323,0	748,0
Días en lactancia, d	99,1	59,2	15,0	273,0
PB de la dieta, %	16,17	2,46	9,40	28,20
Consumo de PB, kg / d	3,51	0,71	1,60	5,30
PDR, % PB	63,5	4,2	49,1	71,2
PNDR, % PB	36,6	4,0	28,8	50,9
FDN, % MS	32,4	5,7	15,7	50,7
FDA, % MS	20,3	4,2	11,2	32,9
CNF, % MS	42,7	6,1	10,1	55,0
EN <sub>L</sub>	1,6	0,1	1,5	1,8
Consumo de MS, kg/ VO / d	21,72	3,18	13,10	30,20
Producción de leche, kg / VO / d	32,77	7,27	13,00	47,70
Producción de leche, kg LCG4% / VO / d	30,00	8,37	6,20	46,98
Proteína en leche, %	3,13	0,27	1,80	4,10
Rendimiento proteína en leche, kg / d	1,03	0,26	0,50	3,10
EUN, % N leche / N consumido	28,76	5,28	15,70	59,60
NUL, mg / dL	15,25	7,12	3,70	36,60
<b>Partición de Nitrógeno</b>				
N en orina, %	33,57	7,97	14,30	61,42
N en heces, %	33,99	7,92	4,80	55,10
N excretado, %	65,42	11,33	29,09	88,90
<b>Metano</b>				
Emisión de CH <sub>4</sub> , g / VO / d	527,41	135,66	276,00	743,00
Emisión de CH <sub>4</sub> , g / kg CMS	25,29	5,51	17,70	34,00
Intensidad de emisión de CH <sub>4</sub> , g / kg Leche	17,72	4,58	10,35	25,60

**Referencias:** DE: desvío estándar; Mín.: mínimo; Max: máximo. PB: proteína bruta; VO: vaca en ordeño; CMS: consumo de materia seca; LCG4%: leche corregida en grasa al 4%; EUN: eficiencia en el uso del N; NUL: N ureico en leche (n= 179); CH<sub>4</sub>: metano entérico (n= 27); N en orina y heces: n = 161; N excretado total: n=168). De los 222 casos, 220 son con vacas Holstein 100%.

### 3.3.1. Análisis de componentes principales

Al realizar el análisis de componentes principales, el 71% de la variación fue explicada por las primeras dos componentes (Figura 3.1), siendo la dimensión 1 responsable del 49,1% y la dimensión 2 del 21,9%. La PL, el consumo de N y la cantidad total de N excretado (heces + orina) fueron las variables que mayor peso tuvieron en la primera componente. Al mismo tiempo, estas tres variables fueron las de mayor contribución en el análisis, seguidas de la secreción de N en leche, la excreción de N en orina y en bosta y la EUN. En la segunda componente, las variables con mayor peso fueron NUL, el balance de N y la EUN. Sin embargo, NUL y el balance de N fueron las dos variables de menor contribución.



**Figura 3.1:** Representación gráfica del análisis de componentes principales de las variables utilizadas en el trabajo.

**Referencias:** Producción de leche (LCG), consumo de N, N en leche, en orina, en heces, N retenido, eficiencia en el uso del N (EUN) y urea en leche (NUL).

En la Figura 3.1 se puede observar que la EUN estuvo directamente relacionada con la PL y la secreción de N en leche, e inversamente relacionada con el N excretado vía orina, el consumo de N y el N total excretado. Al mismo tiempo, NUL estuvo directamente relacionado con el balance de N (N retenido por el animal) y el N eliminado vía orina, e inversamente relacionado con la EUN y en menor medida con la producción de leche. La alta correlación negativa entre la concentración de NUL y la EUN demuestra su utilidad como indicador de la eficiencia de utilización de dicho nutriente.

### 3.3.2. Análisis de conglomerados

El análisis de conglomerados permitió agrupar a los trabajos evaluados en 4 grupos (G) con un criterio de diferenciación de conglomerados al 30%. En la Tabla 3.2 se presentan las medias y desvíos estándar por grupo de conglomerado obtenido según las variables evaluadas.

**Tabla 3.2:** Medias y desvío estándar por grupo de conglomerado obtenido según las variables evaluadas.

<b>Variables</b>	<b>G1 (n= 49)</b>	<b>G2 (n= 88)</b>	<b>G3 (n= 49)</b>	<b>G4 (n= 36)</b>
Porcentaje PB dieta, %	18,8 ± 2,6 <sup>c</sup>	16,4 ± 1,3 <sup>b</sup>	14,2 ± 2,0 <sup>a</sup>	14,8 ± 1,5 <sup>a</sup>
Días en lactancia, d	103,6 ± 29,3 <sup>b</sup>	64,6 ± 26,9 <sup>a</sup>	157,5 ± 77,4 <sup>c</sup>	97,9 ± 55,9 <sup>b</sup>
Producción de Leche, kg /VO / d	31,7 ± 5,2 <sup>b</sup>	38,2 ± 3,1 <sup>c</sup>	22,9 ± 5,4 <sup>a</sup>	34,4 ± 5,4 <sup>b</sup>
EUN, %	24,1 ± 2,4 <sup>a</sup>	29,6 ± 2,7 <sup>c</sup>	26,9 ± 3,6 <sup>b</sup>	36,8 ± 6,6 <sup>d</sup>
Proteína en leche, %	3,1 ± 0,3 <sup>b</sup>	3,0 ± 0,2 <sup>a</sup>	3,3 ± 0,3 <sup>c</sup>	3,2 ± 0,2 <sup>c</sup>
N ureico en leche, mg / dL	17,9 ± 7,7 <sup>b</sup>	15,1 ± 6,8 <sup>a</sup>	13,4 ± 7,7 <sup>a</sup>	13,8 ± 5,5 <sup>a</sup>
Consumo de MS, kg / VO / d	21,8 ± 3,4 <sup>b</sup>	23,3 ± 2,6 <sup>c</sup>	19,3 ± 2,6 <sup>a</sup>	21,0 ± 2,5 <sup>b</sup>
Consumo de N, g/ VO / d	647,3 ± 87,5 <sup>b</sup>	600,5 ± 105,7 <sup>b</sup>	442,2 ± 90,9 <sup>a</sup>	480,5 ± 66,7 <sup>a</sup>
N en orina, % CN	37,5 ± 8,3 <sup>b</sup>	34,4 ± 6,6 <sup>b</sup>	30,1 ± 7,8 <sup>a</sup>	28,7 ± 7,0 <sup>a</sup>
N en heces, % CN	31,6 ± 7,9 <sup>a</sup>	36,1 ± 8,8 <sup>b</sup>	30,7 ± 4,9 <sup>a</sup>	38,3 ± 5,9 <sup>b</sup>
Total N excretado, % CN	69,0 ± 6,9 <sup>b</sup>	64,8 ± 15,0 <sup>b</sup>	60,8 ± 8,4 <sup>a</sup>	67,0 ± 7,9 <sup>b</sup>
Emisión de CH <sub>4</sub> , g / VO / d	551,8 ± 127,0 <sup>b</sup>	590,8 ± 104,7 <sup>b</sup>	477,3 ± 172,0 <sup>ab</sup>	365,2 ± 66,5 <sup>a</sup>
IE, gCH <sub>4</sub> / kg CMS	27,1 ± 5,9 <sup>b</sup>	26,0 ± 4,6 <sup>b</sup>	24,7 ± 4,7 <sup>ab</sup>	18,8 ± 0,4 <sup>a</sup>
IE, gCH <sub>4</sub> / kg PL	19,9 ± 4,8 <sup>b</sup>	16,2 ± 2,2 <sup>b</sup>	20,9 ± 2,5 <sup>a</sup>	12,0 ± 1,6 <sup>ab</sup>

**Referencias:** PB: proteína bruta; LCG: leche corregida por grasa 4% N: nitrógeno; EUN: eficiencia en el uso del nitrógeno; NUL: nitrógeno ureico en leche; CN: consumo de N; IE: Intensidad de emisión.

<sup>abcd</sup> Letras diferentes en igual fila indican diferencias significativas entre medias. \* P < 0,05; \*\* P < 0,01; \*\*\* P < 0,001.

El G2 agrupó al mayor número de dietas evaluadas y el G4 presentó la menor cantidad de casos, seguido del G1 y G3. El G1 representó a aquellos casos de estudio en donde los niveles de PB fueron mayores, generando un mayor consumo de N, logrando una producción de leche intermedia, pero una baja EUN y por lo tanto una mayor excreción de N al ambiente, principalmente vía orina. En G2 agrupó a aquellos tratamientos con valores similares a los recomendados por bibliografía internacional (16% PB aproximadamente), con una PL mayor y con vacas con menor cantidad de DEL con respecto al resto de los grupos. El G3 y G4 agrupación a aquellos tratamientos con menor contenido de PB en la dieta y similares entre ellos. Sin embargo, G4 obtuvo una EUN mayor, probablemente debido a la mayor PL y menor cantidad de DEL de los animales.

### 3.3.3. Regresiones aleatorias

Como ya se ha mencionado anteriormente, la determinación adecuada de los requerimientos de proteína animal es de importancia crítica para maximizar la producción de leche. Como último punto de la revisión sistemática, se decidió realizar las regresiones aleatorias de las variables directamente o inversamente más relacionadas entre sí, que consideramos de mayor importancia, según el análisis de componentes principales. En la Tabla 3.3 se presentan las diferentes ecuaciones de regresiones lineales obtenidas según el análisis. En cada caso se evaluó la significancia del efecto fijo o aleatorio sobre la ordenada al origen y la pendiente mediante los diferentes modelos de regresiones previamente desarrollados.

**Tabla 3.3:** Regresiones lineales obtenidas en función del nivel de PB en 53 ensayos y 222 dietas con diferente contenido de PB de la dieta entregada a vacas en lactancia.

Variable	Ord <sup>1</sup>	EE <sup>2</sup>	EFO <sup>3</sup>	EAO <sup>4</sup>	Pte. <sup>5</sup>	EE <sup>2</sup>	EFP <sup>6</sup>	EAP <sup>7</sup>	Corr <sup>8</sup>
PL, kg / VO / d	21,84	2,62	***	***	0,66	0,15	***	***	0,93
Proteína en leche, %	3,08	0,10	***	***	0,003	0,01	NS	NS	0,95
Consumo de MS, kg	19,86	0,85	***	***	0,09	0,05	NS	NS	0,87
EUN, %	45,89	2,32	***	***	-1,05	0,15	***	***	0,96
NUL, mg / dL	-9,35	1,62	**	***	1,56	0,08	***	NS	0,79

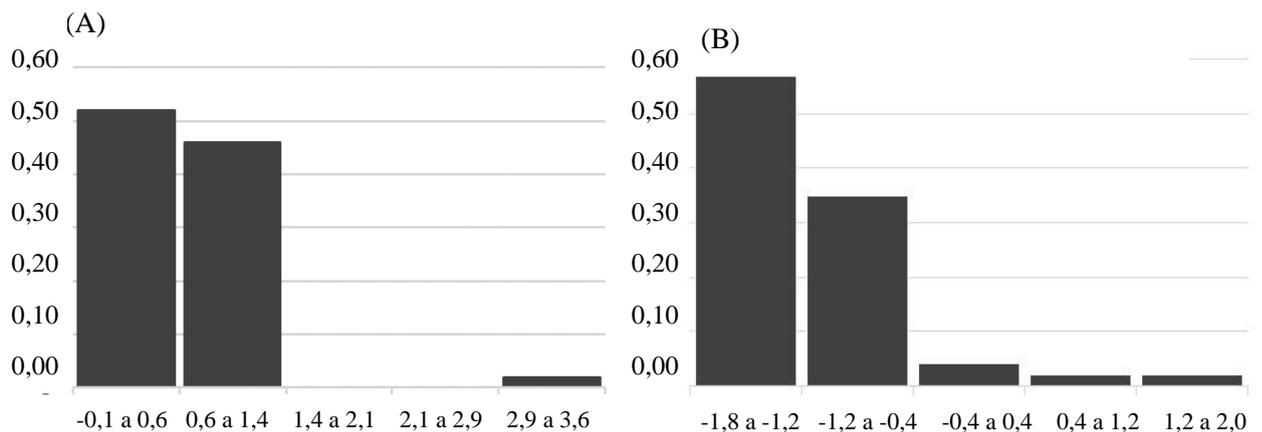
**Referencias:**<sup>1</sup> Ord: ordenada al origen; <sup>2</sup> EE: error estándar; <sup>3</sup> EFO: significancia del efecto fijo sobre la ordenada, <sup>4</sup> EAO: significancia del efecto aleatorio sobre la ordenada; <sup>5</sup> Pte: pendiente; <sup>6</sup> EFP: significancia del efecto fijo sobre la pendiente, <sup>7</sup> EAP: significancia del efecto aleatorio sobre la pendiente; <sup>8</sup> Corr correlación; NUL: N ureico en leche; EUN: eficiencia en el uso del N = N secretado en la leche (g) / N consumido (g) x 100. Significancias: \* P < 0,05; \*\* P < 0,01; \*\*\* P < 0,001.

El rendimiento de PL aumentó a un ritmo decreciente a medida que la concentración de PB en la dieta se incrementó, tanto en este trabajo como en estudios anteriores (Owens, 2014). Como

se puede observar en la Tabla 3.3 para el caso de proteína en leche, consumo de MS y NUL, se utilizaron modelos de regresión aleatoria con efecto fijo sobre la ordenada al origen y la pendiente, pero con efecto aleatorio solamente sobre la ordenada. Esto quiere decir que, si bien las ordenadas al origen obtenidas fueron diferentes para todos los estudios evaluados, las pendientes fueron iguales. Por lo tanto, se podría decir que para % de proteína en leche, por cada unidad de aumento en el % PB, aumentó 0,003 el % de proteína en leche. De igual forma, para CMS y NUL, en donde por cada unidad de aumento del % PB, aumentó 0,09 unidades de CMS y 1,56 unidades de NUL.

Sin embargo, para PL y EUN, se utilizó un modelo de regresión aleatoria con efecto fijo y efecto aleatorio sobre la ordenada al origen y la pendiente. Esto quiere decir que las ordenadas y las pendientes obtenidas fueron diferentes para todos los estudios evaluados. En la Figura 3.2 podemos observar la distribución de frecuencias de las pendientes obtenidas para PL y EUN.

Los pequeños cambios en la producción pueden resultar difíciles de detectar (y pueden no ser estadísticamente significativos) y muy variables en estudios individuales o en ensayos a nivel sistema. Sin embargo, estas disminuciones deben ser motivo de preocupación cuando se evalúan las recomendaciones de que las concentraciones de PB deben reducirse simplemente para disminuir la excreción de N y mejorar la eficiencia de la conversión de la proteína suministrada en rendimiento proteico en leche. Según Broderick (2003), el aumento del consumo de N no siempre conduce a un mejor desempeño de la lactancia (Santos *et al.*, 1998; Monteils *et al.*, 2002; Bach, 2013), especialmente en los niveles más altos de PB consumida.



**Figura 3.2:** Distribución de frecuencias obtenidas en las regresiones aleatorias para el caso de la pendiente de producción de leche (A) y la eficiencia en el uso del nitrógeno (B).

Para el caso de la PL, al ver la gran variación existente en los resultados obtenidos, se decidió evaluar la respuesta cuadrática para el análisis de regresiones aleatorias, el cual dio

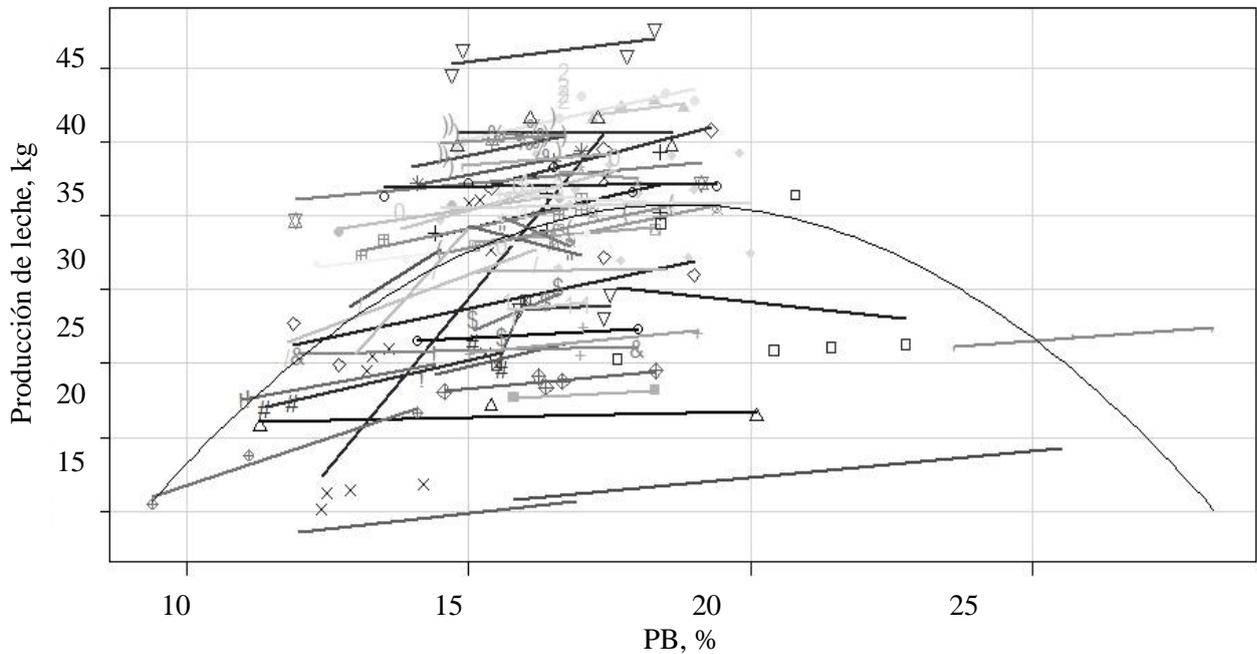
estadísticamente significativo ( $P < 0,01$ ). El modelo general obtenido fue:  $PL = -1,19 (\pm 7,88) + (3,54 (\pm 0,94) \times \%PB) + (-0,09 (\pm 0,03) \times (\%PB)^2)$ .

Considerando la amplia diversidad en el rendimiento en leche y los días en lactancia entre los trabajos evaluados, parece sorprendente que se requiriera un 19,9% de PB en la dieta para alcanzar el rendimiento máximo de la leche de 34,0 kg/día (Figura 3.3). Esta concentración es considerablemente mayor a la observada en los sistemas comerciales evaluados a nivel nacional (apartado 2.7). Sin embargo, este nivel es inferior a la estimación de la NRC (2001), en la cual se requiere un 23% PB para obtener la máxima PL, y la obtenida por Owens (2014), en donde con un 20,6% PB se logra obtener una PL máxima de 32,75 kg/día.

Esta concentración es considerablemente mayor al observado en la mayoría de los sistemas lecheros de Argentina. Sin embargo, es inferior a la estimación de la NRC (2001) de que se necesita un 23% de PB en la dieta para obtener el máximo rendimiento lechero (Owens, 2014). Basado en los promedios de la ecuación obtenida por el modelo cuadrático, una disminución en la proteína de la dieta de 18 a 17, 16 y 15% de la MS de la dieta debe esperarse que disminuya la PL en un promedio de 0,4; 1,0 y 1,7 kg/d por debajo de la PL con una PB de la dieta del 18%. Dichos valores son menores a los observados por (Owens, 2014).

La concentración de la proteína de la leche, a menudo utilizada como índice de adecuación del nivel de PB, no tiene una respuesta muy clara a los niveles de PB de las dietas. Uno esperaría que la concentración de proteína de la leche aumente cuando se proporciona mayor cantidad de proteína suplementaria y por lo tanto aumente la PL. Sin embargo, no se detectó tal respuesta en estos ensayos (Figura 3.4), obteniéndose una pendiente negativa en la regresión general evaluada (Tabla 3.3).

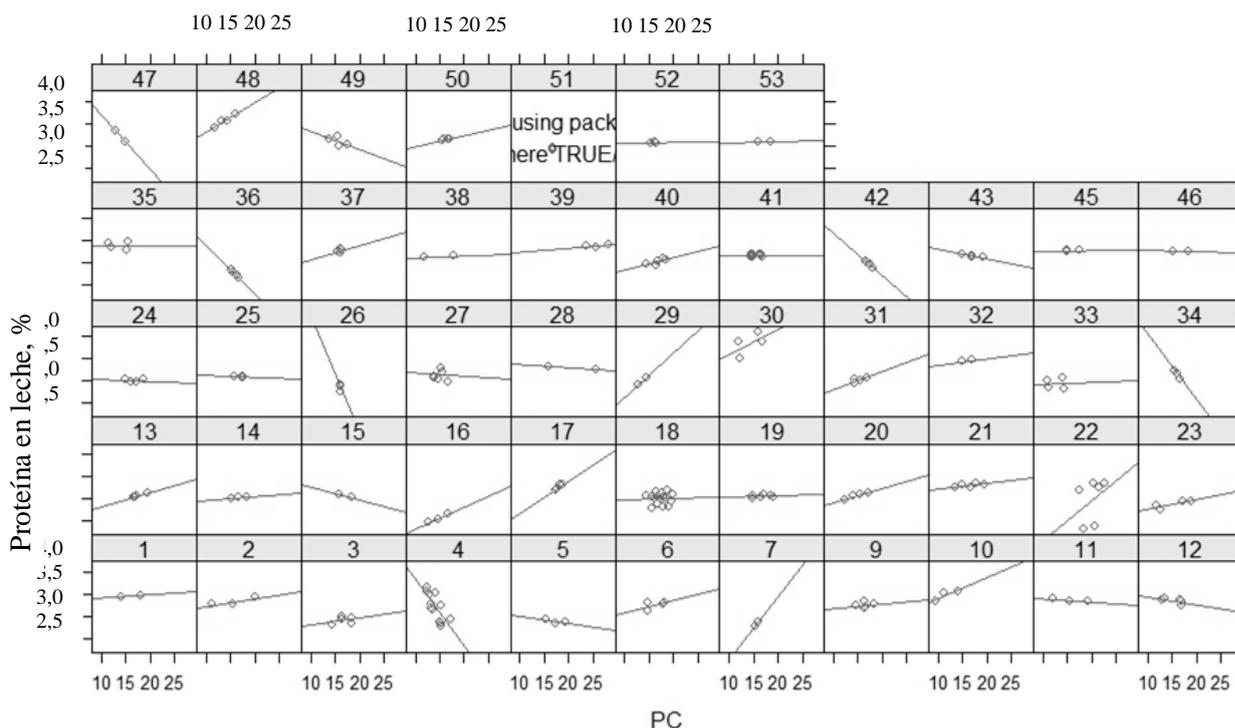
En un ensayo realizado por Leonardi *et al.* (2003), la concentración de proteína de leche disminuyó cuando la proteína de la dieta se incrementó. Lo mismo fue observado por Niu *et al.* (2016). Según Barros *et al.* (2017), la diferencia entre los tratamientos puede ser el resultado de diferentes mecanismos subyacentes que dependen de la severidad de la reducción en la PB de la dieta. En los casos en los que se observó un aumento del rendimiento de proteína en leche, esto fue generalmente el resultado de un aumento del CMS (Broderick, 2003).



**Figura 3.3:** Regresiones individuales en cada uno de los ensayos evaluados y regresión cuadrática general obtenida del análisis grupal.

**Referencia:** ○ Piepenbrink *et al.*, 1996; △ Metcalf *et al.*, 1996; + Cunningham *et al.*, 1996; x Kalscheur *et al.*, 1999; ◇ Wu y Satter, 2000; ▽ Bach *et al.*, 2000; ⊠ Schor y Gagliostro, 2001; \* M'hamed *et al.*, 2001; ⊕ Castillo *et al.*, 2001; ⊕ Ruiz *et al.*, 2002; ⊗ Kokkonen *et al.*, 2002; ⊕ Frank y Swensson, 2002; ⊗ Davidson *et al.*, 2003; ⊕ Broderick., 2003; ■ Hristov *et al.*, 2004; ● Raggio *et al.*, 2004; ▲ Reynal y Broderick, 2005; ◆ Groff y Wu, 2005; ● Ipharraguerre *et al.*, 2005; ● Kalscheur *et al.*, 2006; ○ Colmenero y Broderick, 2006; □ van Dorland *et al.*, 2007; ◇ Metcalf *et al.*, 2008; △ Broderick *et al.*, 2008; Imaizumi *et al.*, 2010; ! Aguerre *et al.*, 2011; " Lee *et al.*, 2011; # Staerfl *et al.*, 2012; \$ Haque *et al.* 2012; % Cantalapiedra-Hijar *et al.*, 2014; &Doreau *et al.*, 2014; ' Arriola Apelo *et al.*, 2014; ! Sutter *et al.*, 2017; / Barros *et al.*, 2017; 0 Kauffman *et al.*, 2017; 1 Corea *et al.*, 2017; 2 Savari *et al.*, 2018; 3 Ebrahimi *et al.*, 2018; 4 Chen *et al.*, 2018.

Al igual que la concentración proteica de la leche, el CMS ha tenido respuestas variables a lo largo de los trabajos evaluados. Si bien un CMS deprimido en las vacas con dietas con baja PB podría deberse a un funcionamiento deficiente del rumen a través de la actividad microbiana suprimida o la regulación fisiológica del consumo (Allen, 2000), en algunos trabajos no se observaron diferencias significativas en los diferentes tratamientos. Lo mismo observaron Colmenero y Broderick (2006) en vacas en lactancia temprana y media, al igual que Cunningham *et al.* (1996) y Leonardi *et al.* (2003), quienes detectaron poco efecto del contenido de PB en la dieta sobre el CMS.



**Figura 3.4:** Regresiones individuales en cada uno de los trabajos evaluados.

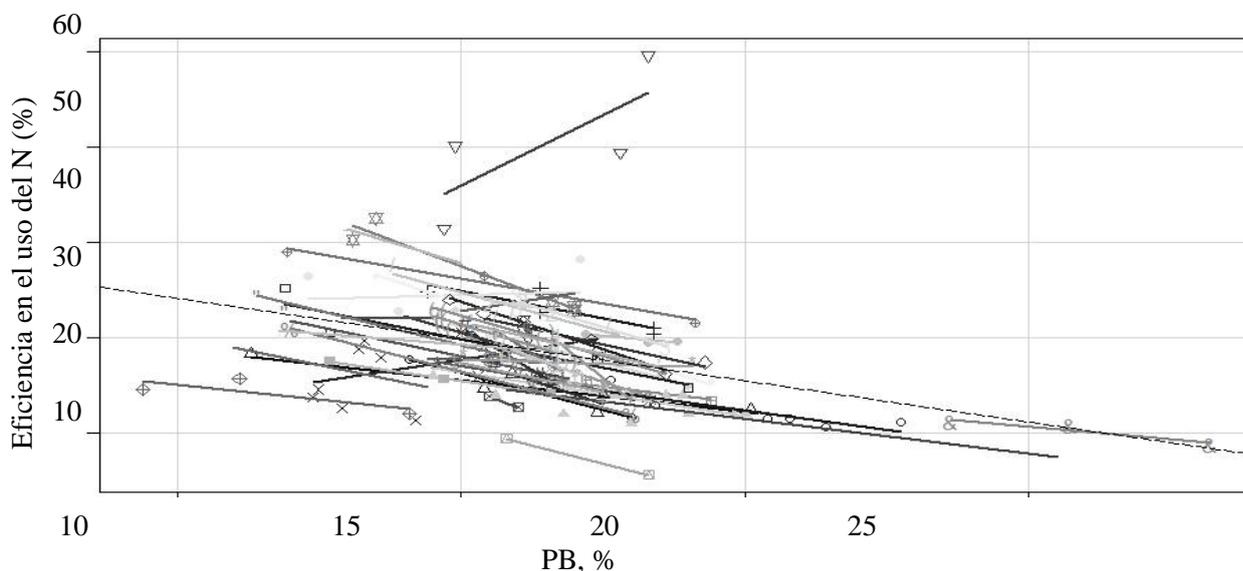
**Referencia:** 1: Piepenbrink *et al.*, 1996; 2: Metcalf *et al.*, 1996; 3: Cunningham *et al.*, 1996; 4: Kalscheur *et al.*, 1999; 5: Wu y Satter, 2000; 6: Bach *et al.*, 2000; 7: Schor y Gagliostro, 2001; 8: M'hamed *et al.*, 2001; 9: Castillo *et al.*, 2001; 10: Ruiz *et al.*, 2002; 11: Kokkonen *et al.*, 2002; 12: Frank y Swensson, 2002; 13: Davidson *et al.*, 2003; 14: Broderick., 2003; 15: Hristov *et al.*, 2004; 16: Raggio *et al.*, 2004; 17: Reynal y Broderick, 2005; 18: Groff y Wu, 2005; 19: Ipharraguerre *et al.*, 2005; 20: Kalscheur *et al.*, 2006; 21: Colmenero y Broderick, 2006; 22: van Dorland *et al.*, 2007; 23: Metcalf *et al.*, 2008; 24: Broderick *et al.*, 2008; 25: Imaizumi *et al.*, 2010; 26: Aguerre *et al.*, 2011; 27: Lee *et al.*, 2011; 28: Staerfl *et al.*, 2012; 29: Haque *et al.*, 2012; 30: Cantalapiedra-Hijar *et al.*, 2014; 31: Doreau *et al.*, 2014; 32: Arriola Apelo *et al.*, 2014; 33: Fanchone *et al.*, 2014; 34: Hassanat *et al.*, 2013; 35: Spek *et al.*, 2013; 36: Recktenwald *et al.*, 2014; 37: Neal *et al.*, 2014; 38: Edouard *et al.*, 2016; 39: Reid *et al.*, 2015; 40: Rinne *et al.*, 2015; 41: Broderick *et al.*, 2015; 42: Arndt *et al.*, 2015; 43: Mohtashami *et al.*, 2016; 44: Hynes *et al.*, 2016; 45: Mutsvangwa *et al.*, 2016; 46: Niu *et al.*, 2016; 47: Sutter *et al.*, 2017; 48: Barros *et al.*, 2017; 49: Kauffman *et al.*, 2017; 50: Corea *et al.*, 2017; 51: Savari *et al.*, 2018; 52: Ebrahimi *et al.*, 2018; 53: Chen *et al.*, 2018.

Con respecto al efecto del contenido proteico de las dietas sobre la EUN, la respuesta es más exacta. En un reciente meta-análisis de un gran conjunto de datos realizado por Huhtanen *et al.* (2008), la concentración de PB fue una de los mejores predictores de la EUN. Aunque, dependiendo de la dieta basal, el aumento del aporte de N puede producir un aumento en la producción de proteína de leche, la eficiencia de la conversión de N en proteína de leche disminuirá de manera predecible (Colmenero y Broderick, 2006). Salvo en el trabajo de Bach *et al.* (2000), quien utilizó vacas lecheras con muy alta producción de leche (promedio 46,1 kg / VO / d) al inicio

de la lactancia (25 DEL), en el resto de los trabajos evaluados, a medida que el consumo de N aumentó, la EUN (en g de leche N por g de N consumido) disminuyó linealmente (Tabla 3.3).

El modelo cuadrático evaluado no dio estadísticamente significativo ( $P = 0,91$ ). Dichos resultados confirman las respuestas obtenidas en diferentes estudios que encontraron mayores eficiencias en el uso de N en vacas lecheras en lactancia en respuesta a menores consumos de N (Figura 3.5). El modelo general obtenido fue:  $EUN = 45,10 (2,32) + (1,03 (0,15) \times \%PB)$ .

El aumento de PB de 13,0 a 16,0% redujo la eficiencia de N en 3,1 unidades porcentuales, y se redujo 2,1% cuando la PB aumentó de 16,0% a 18,0%. En síntesis, una reducción en la concentración de PB de la dieta provoca un aumento en la EUN (Huhtanen y Hristov, 2009) y, por lo tanto, el nivel de PB en la dieta debe reducirse en un intento por mejorar la EUN y minimizar las pérdidas de N (Castillo *et al.*, 2000; Sinclair *et al.*, 2014).



**Figura 3.5:** Regresiones individuales en cada uno de los ensayos evaluados y regresión lineal general obtenida del análisis grupal.

**Referencia:** ○ Piepenbrink *et al.*, 1996; Δ Metcalf *et al.*, 1996; + Cunningham *et al.*, 1996; x Kalscheur *et al.*, 1999; ◇ Wu y Satter, ▽ 2000; Bach *et al.*, 2000; ◻ Schor y Gagliostro, 2001; \* M'hamed *et al.*, 2001; ◊ Castillo *et al.*, 2001; ◈ Ruiz *et al.*, 2002; ✕ Kokkonen *et al.*, 2002; ◻ Frank y Swensson, 2002; ✕ Davidson *et al.*, 2003; ◻ Broderick., 2003; ■ Hristov *et al.*, 2004; ● Raggio *et al.*, 2004; ▲ Reynal y Broderick, 2005; ◆ Groff y Wu, 2005; ● Ipharraguerre *et al.*, 2005; ● Kalscheur *et al.*, 2006; ○ Colmenero y Broderick, 2006; ◻ van Dorland *et al.*, 2007; ◇ Metcalf *et al.*, 2008; Δ Broderick *et al.*, 2008; Imaizumi *et al.*, 2010; ! Aguerre *et al.*, 2011; " Lee *et al.*, 2011; # Staerfl *et al.*, 2012; \$ Haque *et al.* 2012; % Cantalapedra-Hijar *et al.*, 2014; & Doreau *et al.*, 2014; ' Arriola Apelo *et al.*, 2014; ! Fanchone *et al.*, 2014; " Hassanat *et al.*, 2013; # Spek *et al.*, 2013; \$ Recktenwald *et al.*, 2014; % Neal *et al.*, 2014; & Edouard *et al.*, 2016; ' Reid *et al.*, 2015; ( Rinne *et al.*, 2015; ) Broderick *et al.*, 2015; \* Arndt *et al.*, 2015; ;+ Mohtashami *et al.*, 2016; ◆ Hynes *et al.*, 2016; ' Mutsvangwa *et al.*, 2016; - Niu *et al.*, 2016; . Sutter

et al., 2017; / Barros *et al.*, 2017; 0 Kauffman *et al.*, 2017; 1 Corea *et al.*, 2017; 2 Savari *et al.*, 2018; 3 Ebrahimi *et al.*, 2018;4 Chen *et al.*, 2018.

Otros cambios detectados con concentraciones más altas de PB en la dieta incluyeron aumentos lineales en las concentraciones de NUL. Como ya se mencionó, el NUL ha sido ampliamente estudiado como una herramienta para predecir la EUN de la dieta en vacas lecheras y las pérdidas de N al ambiente (Kauffman y St. Pierre, 2001). Al ser un producto final del metabolismo de las proteínas, está claramente relacionada con la concentración de PB en la dieta (Colmenero y Broderick, 2006; Lee *et al.*, 2011). Por lo tanto, un aumento en el consumo de PB condujo a mayores concentraciones de NUL.

### **3.4. CONCLUSIONES**

En los últimos 23 años se han realizado un número importante de ensayos en los cuales se ha considerado el efecto de la PB de la dieta sobre la PL, la calidad de la misma y la EUN. La revisión sistemática permitió generar una síntesis de la evidencia disponible para proseguir con el análisis en profundidad de las relaciones entre las variables. Si bien en algunas variables, como CMS, proteína en leche (%) y NUL, tuvieron poca variabilidad de respuesta entre los estudios evaluados, la PL individual y la EUN tuvieron una respuesta variable, siendo ambas variables de importancia para el costo de la dieta y el resultado económico final. La alta correlación negativa entre la concentración de NUL y la EUN demuestra su utilidad como indicador de la eficiencia de utilización de dicho nutriente.

Uno de los factores críticos en la nutrición de las vacas lecheras para lograr maximizar la producción y el resultado económico es proporcionar una cantidad adecuada de PB en la dieta es, minimizando la eliminación de N al ambiente mediante las excretas. Sin embargo, si bien un aumento de la PB entregada en la dieta puede permitir un mayor rendimiento en leche, con niveles de proteína en leche variables, la EUN disminuirá de manera esperable, siendo necesario lograr un equilibrio que sea económicamente sostenible entre dichas variables.

### **3.5. REFERENCIAS**

Aguerre, M.J.; Wattiaux, M.A.; Powell, J.M.; Broderick, G.A.; Arndt, C. (2011). Effect of forage-to-concentrate ratio in dairy cow diets on emission of methane, carbon dioxide, and

- ammonia, lactation performance, and manure excretion. *J. Dairy Sci.* **94**, 3081-3093.
- Allen, M.S. (2000). Effects of diet on short-term regulation of feed intake by lactating dairy cattle. *J. Dairy Sci.* **83**, 1598–1624.
- Arndt, C.; Powell, J.M.; Aguerre, M.J.; Wattiaux, M.A. (2015). Performance, digestion, nitrogen balance, and emission of manure ammonia, enteric methane, and carbon dioxide in lactating cows fed diets with varying alfalfa silage-to-corn silage ratios. *J. Dairy Sci.* **98**, 418–430.
- Arriola Apelo, S.I.; Bell, A.L.; Estes, K.; Ropelewski, J.; de Veth, M.J.; Hanigan, M.D. (2014). Effects of reduced dietary protein and supplemental rumen-protected essential amino acids on the nitrogen efficiency of dairy cows. *J. Dairy Sci.* **97**, 5688–5699.
- Bach, A. (2013). Key indicators for measuring dairy cow performance. (Eds. Makkar, H.P.S. and Beever, D.) In: Optimization of feed use efficiency in ruminant production systems. Proceedings of the FAO Symposium, 27 November 2012, Bangkok, Thailand. FAO Animal Production and Health Proceedings, No. 16. Rome, FAO and Asian-Australasian Association of Animal Production Societies. 33-44.
- Bach, A.; Huntington, G.B.; Calsamiglia, S.; Stern, M.D. (2000). Nitrogen Metabolism of Early Lactation Cows Fed Diets with Two Different Levels of Protein and Different Amino Acid Profiles. *J. Dairy Sci.* **83**, 2585–2595.
- Barros, T.; Quaassdorff, M.A.; Aguerre, M.A.; Colmenero, J.J.O.; Bertics, S.J.; Crump, P.M.; Wattiaux, M.A. (2017). Effects of dietary crude protein concentration on late-lactation dairy cow performance and indicators of nitrogen utilization. *J. Dairy Sci.* **100**, 1–15.
- Broderick, G. A. (2003). Effects of varying dietary protein and energy levels on the production of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* **86**, 1370–1381.
- Broderick, G.A.; Stevenson, M.J.; Patton, R.A.; Lobos, N.E.; Colmenero, O.J.J. (2008). Effect of supplementing rumen-protected methionine on production and nitrogen excretion in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* **92**, 2719–2728.
- Broderick, G.A.; Faciola, A.P.; Armentano, L.E. (2015). Replacing dietary soybean meal with canola meal improves production and efficiency of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* **98**, 5672–5687.

- Cantalapiedra-Hijar, G.; Peyraud, J.L.; Lemosquet, S.; Molina-Alcaide, E.; Boudra, H.; Noziere, P. Ortigues-Marty; I. (2014). Dietary carbohydrate composition modifies the milk N efficiency in late lactation cows fed low crude protein diets. *Animal*. **8**, 275–285.
- Castillo, A.R.; Kebreab, E.; Beever, D.E.; Barbi, J.H.; Sutton, J.D.; Kirby, H.C.; France, J. (2001). The effect of protein supplementation on nitrogen utilization in lactating dairy cows fed grass silage diets. *J. Anim. Sci.* **79**, 247-253.
- Chen, Y.; Harrisonb, J.H.; Buntingc, L.D. (2018). Effects of replacement of alfalfa silage with corn silage and supplementation of methionine analog and lysine-HCl on milk production and nitrogen feed efficiency in early lactating cows. *Animal Feed Science and Technology*. **242**, 120–126.
- Colmenero, O.J.J.; Broderick, G.A. (2006). Broderick effect of dietary crude protein concentration on milk production and nitrogen utilization in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* **89**, 1704-1712.
- Corea, E.E.; Aguilara, J.M.; Alasa, N.P.; Alasa, E.A.; Floresa, J.M.; Broderick, G.A. (2017). Effects of dietary cowpea (*Vigna sinensis*) hay and protein level on milk yield, milk composition, N efficiency and profitability of dairy cows. *Animal Feed Science and Technology*. **226**, 48–55.
- Cunningham, K.D.; Cecava, M.J.; Johnson, T.R.; Ludden, P.A. (1996). Influence of Source and Amount of Dietary Protein on Milk Yield by Cows in Early Lactation. *J. Dairy Sci.* **79**, 620-630.
- Davidson, S.; Hopkins, B.A.; Diaz, D.E.; Bolt, S.M.; Brownie, C.; Fellner, V.; Whitlow, L.W. (2003). Effects of Amounts and Degradability of Dietary Protein on Lactation, Nitrogen Utilization, and Excretion in Early Lactation Holstein Cows. *J. Dairy Sci.* **86**, 1681–1689
- Doreau, M.; Ferlay, A.; Rochette, Y.; Martin, C. (2014). Effects of dehydrated lucerne and soya bean meal on milk production and composition, nutrient digestion, and methane and nitrogen losses in dairy cows receiving two different forages. *Animal*. **8** (3), 420-430.
- Ebrahimi, S.; Ebrahimi, S.H.; Naserian, A.A.; Valizadeh, R. (2018). A New Low Protein Feeding Strategy for Enhancing Nitrogen Utilization in Lactating Dairy Cows. *J. Vet. Sci. Technol.* **9**, 2.

- Edouard, N.; Hassouna, M.; Robin, P.; Faverdin, P. (2016). Low degradable protein supply to increase nitrogen efficiency in lactating dairy cows and reduce environmental impacts at barn level. *Animal*. **10** (2), 212–220.
- Fanchone, A.; Nozière, P.; Portelli, J.; Duriot, B.; Largeau, V.; Doreau, M. (2014). Effects of nitrogen underfeeding and energy source on nitrogen ruminal metabolism, digestion, and nitrogen partitioning in dairy cows. *J. Anim. Sci.* 2013.**9**, 895–906.
- Frank, B.; Swensson, C. (2002). Relationship between content of crude protein in rations for dairy cows and milk yield, concentration of urea in milk and ammonia emissions. *J. Dairy Sci.* **85**, 1829–1838.
- Groff, E.B.; Wu, Z. (2005). Milk production and nitrogen excretion of dairy cows fed different amounts of protein and varying proportions of alfalfa and corn silage. *J. Dairy Sci.* **88** (10), 3619–3632.
- Hassanat F.; Gervais, R.; Julien, C.; Massé, D.I.; Lettat, A.; Chouinard, P.Y.; Petit, H.V.; Benchaar, C. (2013). Replacing alfalfa silage with corn silage in dairy cow diets: Effects on enteric methane production, ruminal fermentation, digestion, N balance, and milk production. *J. Dairy Sci.* **96**, 4553–4567.
- Higgs, R.J. (2009). Nitrogen use efficiency and sustainable nitrogen management in high producing dairy farms. A Thesis Presented to the Faculty of the Graduate School of Cornell University. <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.1003.2447&rep=rep1&typ>.
- Hristov, A.N.; Etter, R.P.; Ropp, J.K.; Grandeen, K.L. (2004). Effect of dietary crude protein level and degradability on ruminal fermentation and nitrogen utilization in lactating dairy cows. *J. Anim. Sci.* 2004. **82**, 3219–3229.
- Hristov, A.N.; Giallongo, F. (2014). Feeding protein to dairy cows—what should be our target? Proc Tri-State Dairy Nutr Conference; Fort Wayne, IN. 75–84.
- Huhtanen, P.; Nousiainen, J.I.; Rinne, M.; Kytölä, K.; Khalili, H. (2008). Utilization and partition of dietary nitrogen in dairy cows fed grass silage-based diets. *J. Dairy Sci.* **91**, 3589–3599.
- Huhtanen, P.; Hristov, A.N. (2009). A meta-analysis of the effects of dietary protein concentration and degradability on milk protein yield and milk N efficiency in dairy cows. *J. Dairy Sci.*

**92**, 3222–3232.

- Hynes, D.N.; Stergiadis, S.; Gordon, A.; Yan, T. (2016). Effects of crude protein level in concentrate supplements on animal performance and nitrogen utilization of lactating dairy cows fed fresh-cut perennial grass. *J. Dairy Sci.* **99**, 1–10.
- Imaizumi, H.; Santos, F.A.P.; Machado Bittar, C.M.; Correia, P.S.; Martinez, J.C. (2010). Diet crude protein content and sources for lactating dairy cattle. *Sci. Agric.* **67**, 16-22.
- Ipharraguerre, I.R.; Clark, J.H.; Freeman, D.E. (2005). Varying Protein and Starch in the Diet of Dairy Cows. I. Effects on Ruminal Fermentation and Intestinal Supply of Nutrients. *J. Dairy Sci.* **88**, 2537–2555.
- Kalscheur, K.F.; Vandersall, J.H.; Erdman, R.A.; Kohn, R.A.; Russek-Cohen, E. (1999). Effects of Dietary Crude Protein Concentration and Degradability on Milk Production Responses of Early, Mid, and Late Lactation Dairy Cows. *J. Dairy Sci.* **82**, 545–554.
- Kalscheur, K.F.; Baldwin, R.L.; Glenn, B.P.; Kohn, R.A. (2006). Milk Production of Dairy Cows Fed Differing Concentrations of Rumen-Degraded Protein. *J. Dairy Sci.* **89**, 249–259.
- Kauffman, A. J.; St-Pierre, N. (2001). The relationship of milk urea nitrogen excretion in Holstein and Jersey cows. *J. Dairy Sci.* **84**, 2284–2294.
- Kauffman, J.D.; Kassube, K.R.; Ríus, A.G. (2017). Lowering rumen-degradable protein maintained energy-corrected milk yield and improved nitrogen-use efficiency in multiparous lactating dairy cows exposed to heat stress. *J. Dairy Sci.* **100**, 1–14.
- Kokkonen, T.; Tsehai Tesfa, A.; Tuori, M.; Yrjänen, S.; Syrjälä-Qvist, L. (2002). Effect of Concentrate Crude Protein Level on Grass Silage Intake, Milk Yield and Nutrient Utilisation by Dairy Cows in Early Lactation, *Archiv für Tierernaehrung*, **56 (3)**, 213-227.
- Lee, C.; Hristov, A.N.; Heyler, K.S.; Cassidy, T.W.; Long, M.; Corl, B.A.; Karnati, S.K.R. (2011). Effects of dietary protein concentration and coconut oil supplementation on nitrogen utilization and production in dairy cows. *J. Dairy Sci.* **94**, 5544–5557.
- Leonardi, C.; Stevenson, M.; Armentano, L.E. (2003). Effect of two levels of crude protein and methionine supplementation on performance of dairy cows. *J. Dairy Sci.* **86**, 4033–4042.

- M'hamed, D.; Faverdin, P.; Verité, R. (2001). Effects of the level and source of dietary protein on intake and milk yield in dairy cows. *Anim. Res.* **50**, 205–211.
- Metcalf, J.A.; Wray-Cahen, D.; Chettle, E.E.; Sulton, J.J.D.; Beever, D.E.; Crompton, L.A.; Macrae, T.J.C; Bequelte, B.J.; Backwell, F.R.C. (1996). The Effect of Dietary Crude Protein as Protected Soybean Meal on Mammary Metabolism in the Lactating Dairy Cow. *J. Dairy Sci.* **79**, 603:611.
- Metcalf, J.; Mansbridge, R.; Blake, J.; Oldham, J.; Newbold, J. (2008). The efficiency of conversion of metabolisable protein into milk true protein over a range of metabolisable protein intakes. *Animal*. **2**, 1193–1202.
- Mohtashami, B.; Mirzaei, H.R.; Amanlou, A. (2016). Effect of Different Amounts of Protein and Varying Proportions of Corn Silage and Alfalfa hay on Milk Production and Nitrogen Excretion of Dairy Holstein Cows. *Iranian Journal of Applied Animal Science*. **6 (3)**, 505-510.
- Monteils, V.; Jurjanz, S.; Blanchart, G.; Laurent, F. (2002). Nitrogen utilisation by dairy cows fed diets differing in crude protein level with a deficit in ruminal fermentable nitrogen. *Reprod. Nutr. Dev.* **42**, 545–557.
- Mutsvangwa, T.; Davies, K.L.; McKinnon, J.J.; Christensen, D.A. (2016). Effects of dietary crude protein and rumen-degradable protein concentrations on urea recycling, nitrogen balance, omasal nutrient flow, and milk production in dairy cows. *J. Dairy Sci.* **99**, 1–13.
- Neal, K.; Eun, J.S; Young, A.J.; Mjoun, K.; Hall, J.O. (2014). Feeding protein supplements in alfalfa hay-based lactation diets improves nutrient utilization, lactational performance, and feed efficiency of dairy cows. *J. Dairy Sci.* **97**, 7716–7728.
- Niu, M.; Appuhamy, J.A.D.R.N.A.; Leytem, A.B.; Dungan, R.S.; Kebreab, E. (2016). Effect of dietary crude protein and forage contents on enteric methane emissions and nitrogen excretion from dairy cows simultaneously. *Animal Production Science*. **56**,312–321.
- NRC, (2001). Nutrient Requirements of Dairy Cattle. 7th rev. ed. Natl. Acad. Sci., Washington, D.C.
- Owens, F. (2014). Protein Nutrition of Dairy Cattle – An Overview.

<http://dairy.ifas.ufl.edu/rns/2014/owens.pdf>. 25th Symposium. **515**, 53-77.

Piepenbrink, M.S.; Overton, T.R.; Clark, J. H. (1996). Response of Cows Fed a Low Crude Protein Diet to Ruminally Protected Methionine and Lysine. *J. Dairy Sci.* **79**, 1636-1646.

R Core Team (2016) R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

Raggio, G.; Pacheco, D.; Berthiaume, R.; Lobley, G.E.; Pellerin, D.; Allard, G.; Dubreuil, P.; Lapierre, H. (2004). Effect of level of metabolizable protein on splanchnic flux of amino acids in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* **87(10)**, 3461-3472

Recktenwald, E.B.; Ross, D.A.; Fessenden, S.W.; Wall, C.J.; Van Amburgh, M.E. (2014). Urea-N recycling in lactating dairy cows fed diets with 2 different levels of dietary crude protein and starch with or without monensin. *J. Dairy Sci.* **97**, 1611–1622.

Reid, M.; O'Donovan, M.; Elliott, C.T.; Bailey, J.S.; Watson, C.J.; Lalor, S.T.J.; Corrigan, B.; Fenelon, M.A.; Lewis, E. (2015). The effect of dietary crude protein and phosphorus on grass-fed dairy cow production, nutrient status, and milk heat stability. *J. Dairy Sci.* **98**, 517–531.

Reynal, S.M.; Broderick, G.A. (2005). Effect of dietary level of rumen-degraded protein on production and nitrogen metabolism in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* **88**, 4045–4064.

Rinne M.; Kuoppalal, K.; Ahvenjärvi, S.; Vanhatalo, A. (2015). Dairy cow responses to graded levels of rapeseed and soya bean expeller supplementation on a red clover/grass silage-based diet. *Animal*. **9 (12)**, 1958–1969.

Ruiz, R.; Tedeschi, L.O.; Marini, J.C.; Fox, D.G.; Pell, A.N.; Jarvis, G.; Russell, J.B. (2002). The effect of a ruminal nitrogen (N) deficiency in dairy cows: Evaluation of the Cornell Net Carbohydrate and Protein Systems ruminal N deficiency adjustment. *J. Dairy Sci.* **85**, 2986–2999.

Santos, F.A.P.; Santos, J.E.P.; Theurer, C.B.; Huber, J.T. (1998). Effects of rumen-undegradable protein on dairy cow performance: a 12-year literature review. *J. Dairy Sci.* **81 (12)**, 3182–3213.

Savari, M.; Khorvash, M.; Amanlou, H.; Ghorbani, G.R.; Ghasemi, E.; Mirzaei, M. (2018). Effects

- of rumen-degradable protein: rumen -undegradable protein ratio and corn processing on production performance, nitrogen efficiency, and feeding behavior of Holstein dairy cows. *J. Dairy Sci.* **101**, 1–12.
- Schor, A.; Gagliostro, G. (2001). Undegradable Protein Supplementation to Early-Lactation Dairy Cows in Grazing Conditions. *J. Dairy Sci.* **84**, 1597–1606.
- Sinclair, K.D.; Garnsworthy, P.C.; Mann, G.E.; Sinclair, L.A. (2014). Reducir la proteína de la dieta en las dietas de vacas lecheras: implicaciones para la utilización del nitrógeno, la producción de leche, el bienestar y la fertilidad. *Animal*, **8** (2), 262-274.
- Spek, J.; Bannink, A.; Gort, G.; Hendriks, W.; Dijkstra, J. (2013). Interaction between dietary content of protein and sodium chloride on milk urea concentration, urinary urea excretion, renal recycling of urea, and urea transfer to the gastrointestinal tract in dairy cows. *J. Dairy Sci.* **96**, 5734–5745.
- Staerfl, S.M.; Amelchanka, S.L.; Kälber, T.; Soliva, C.R.; Kreuzer, M.; Zeitz, J.O. (2012). Effect of feeding dried high-sugar ryegrass ('AberMagic') on methane and urinary nitrogen emissions of primiparous cows. *Livest. Sci.* **150**, 293–301.
- St-Pierre, N.R. (2001). Integrating quantitative findings from multiple studies using mixed model methodology. *J. Dairy Sci.* **84**, 741–755.
- Sutter, F.; Schwarmb, A.; Kreuzerb, M. (2017). Development of nitrogen and methane losses in the first eight weeks of lactation in Holstein cows subjected to deficiency of utilisable crude protein under restrictive feeding conditions. *Archives of Animal Nutrition.* **71**, 1–20.
- van Dorland, H.A.; Wettstein, H.R.; Leuenberger, H.; Kreuzer, M. (2007). Effect of supplementation of fresh and ensiled clovers to ryegrass on nitrogen loss and methane emission of dairy cows. *Livestock Sci.* **111**, 57–69.
- Wu, Z.; Satter, L.D. (2000). Milk production during the complete lactation of dairy cows fed diets containing different amounts of protein. *J. Dairy Sci.* **83**, 1042–1051.

## **CAPÍTULO 4 - EFICIENCIA EN EL USO DEL NITRÓGENO DE LA DIETA Y EMISIÓN DE METANO EN VACAS HOLSTEIN EN LACTANCIA ALIMENTADAS CON DIETAS CON DIFERENTES NIVELES DE PROTEÍNA.**

### **4.1. INTRODUCCIÓN**

Las emisiones de GEI de los sistemas lecheros incluyen CH<sub>4</sub> y N<sub>2</sub>O provenientes de la fermentación entérica y de las excretas (Rotz, 2018). Por lo tanto, gran parte del impacto ambiental de los tambos está se relaciona con el manejo de la nutrición y de las heces y orina (Herrero *et al.*, 2006).

Históricamente, el objetivo de la nutrición de las vacas lecheras ha sido maximizar la producción de leche (Lapierre *et al.*, 2005). Sin embargo, conociendo el impacto ambiental que puede tener el N, y en base a los resultados observado en el capítulo anterior, fue necesario comenzar a estudiar dietas con menor contenido de PB, que permitan reducir la cantidad de N excretado (Lapierre *et al.*, 2005; van der Stelt *et al.*, 2008; Dijkstra *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2012; Pfeffer *et al.*, 2016) y lograr mejorar la EUN (Gregorini *et al.*, 2016). Esta situación generó que dietas bajas en PB sean cada vez más frecuentemente utilizadas en la nutrición de vacas lecheras (Sutter *et al.*, 2017). Por otra parte, la reducción del contenido de PB en las dietas, sumado a la optimización de la EUN, permitiría disminuir el costo de la alimentación, redundando en un mejor resultado económico para el productor y de una manera amigable con el ambiente (Lapierre *et al.*, 2005). Sin embargo, las opciones de mitigación dirigidas a mejorar la EUN podrían resultar en un aumento en la emisión de CH<sub>4</sub> (Dijkstra *et al.*, 2011). Por lo tanto, existe la necesidad de explorar estrategias nutricionales que permitan reducir la cantidad de N excretado por las vacas lecheras, y que al mismo tiempo reduzcan las emisiones de CH<sub>4</sub> (Dijkstra *et al.*, 2011; Gerber *et al.*, 2013).

El objetivo de este estudio fue evaluar la eficiencia de uso del nitrógeno de la dieta, la emisión de metano entérico, la producción de leche y el resultado económico en vacas Holando Argentino lactando alimentadas con dietas con distinto contenido de proteína bruta.

### **4.2. MATERIALES Y MÉTODOS**

El trabajo se llevó a cabo en el tambo experimental del departamento de Producción Animal de la Estación Experimental Agropecuaria Rafaela del INTA (31° 11'S, 61° 30'O) en Rafaela,

desde el 15 de junio al 17 de septiembre de 2017 (Figura 4.1). El manejo de las vacas utilizadas en este estudio fue realizado de acuerdo con las directrices del Comité de Bienestar Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad del Centro de la provincia de Buenos Aires y aprobado bajo el Acta de Bienestar Animal ResCa 087/02.

#### **4.2.1. Animales y diseño experimental**

---

Doce vacas multíparas Holando Argentino ( $645 \pm 48$  kg de PV;  $2,80 \pm 0,3$  de CC) en lactancia ( $70 \pm 11$  DEL), con una producción de leche de  $35 \pm 6$  kg/día al inicio del ensayo, fueron asignadas aleatoriamente a 1 de 3 tratamientos de acuerdo a un diseño de cuadrado latino  $3 \times 3$  (3 tratamientos y 3 periodos) con seis secuencias (ABC, ACB, BCA, BAC, CAB, CBA) y dos réplicas. Las secuencias fueron utilizadas para evaluar la existencia de efectos residual debido a los tratamientos aplicados.

Cada período tuvo una duración de 29 días, de los cuales 20 fueron de adaptación de los animales a sus tratamientos y los últimos 9 d de colección de datos y muestras. A lo largo del ensayo, las vacas se mantuvieron en un corral seco con piso consolidado (dry-lot), de 48 m de frente  $\times$  45 m de largo, dividido en 12 corrales individuales de igual superficie ( $180 \text{ m}^2/\text{vaca}$ ). Durante el período experimental, las vacas tuvieron libre acceso a agua de bebida y fueron ordeñadas dos veces por día (2:00 am y 1:00 pm). Todas las vacas fueron equipadas con transpondedores en el cuello (ALPRO versión 6.60 / DeLaval, Tumba, Suecia) para registrar individualmente la producción diaria de leche.

#### **4.2.2. Tratamientos experimentales y manejo de alimentación**

---

Los tratamientos utilizados consistieron en tres dietas, las cuales fueron formuladas para contener 13 (BPB), 16 (MPB) o 19 (APB) % de PB. Los niveles de PB utilizados en las dietas fueron seleccionados a partir de la información evaluada en los capítulos 2 y 3, siendo el tratamiento APB cercano a los niveles utilizados a nivel nacional, el tratamiento MPB como el valor recomendado a nivel internacional para dietas con alta EUN y baja excreción de N, y el tratamiento BPB como un valor bajo de PB. La composición química de los principales ingredientes utilizados en la formulación de las dietas se presenta en la Tabla 4.1.

**Tabla 4.1.** Composición química y contenido de energía de los ingredientes utilizados en las dietas experimentales (los datos son valores promedio y desvío estándar de 7 sub-muestras).

Ítem	Silaje de Maíz		Fardo de alfalfa		Harina de soja alta proteína		Grano de maíz (molido)	
	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE
MS, %	27,2	3,8	87,2	4,7	91,9	0,7	88,0	0,7
PB, % de MS	9,5	0,4	19,7	1,7	46,8	2,6	9,4	0,6
FDN, % de MS	40,6	1,3	48,8	3,5	8,4	1,4	11,3	2,6
FDA, % de MS	24,3	2,2	33,5	4,5	4,1	0,6	3,8	0,9
LDA, % de MS	2,1	0,1	8,7	1,9	1,0	0,2	0,6	0,1
EE, % de MS	2,8	0,3	1,6	0,3	1,9	0,5	3,2	0,9
Cenizas, % de MS	5,3	0,6	10,9	1,7	7,2	0,3	2,2	0,8
CNF <sup>1</sup> , %	41,8	1,5	19,0	3,3	35,8	2,9	73,8	2,2
NDT <sup>2</sup>	68,8	0,5	52,5	3,1	81,0	0,5	85,1	2,4
EM, <sup>2</sup>	2,3	0,0	1,8	0,2	3,3	0,0	3,0	0,1
EN <sub>L</sub> , <sup>2</sup> Mcal/kg	1,5	0,0	1,1	0,1	2,1	0,0	1,9	0,1
Degradabilidad de la PB <sup>3</sup>								
a, %	47,3		39,2		25,8		18,5	
b, %	28,5		43,8		67,6		74,5	
c, %/hora	6,3		11,3		8,4		4,1	

**Referencias:** MS, materia seca, PB, proteína bruta, NIDA, nitrógeno unido a la fibra en detergente neutro, FDN, fibra detergente neutra, FDA, fibra detergente ácido, LDA, lignina detergente ácido, EE, extracto etéreo, CNF, carbohidratos no fibrosos, NDT, nutrientes digestibles totales, EM, energía metabolizable, EN<sub>L</sub>, energía neta para lactación, EB, energía bruta. <sup>1</sup> CNF = 100 - (PB % + FDN % + EE % + cenizas %). <sup>2</sup> Estimado usando el modelo NRC (2001). <sup>3</sup> Evaluación en Daisy II (0, 1, 2, 4, 8, 12, 16, 24, 32 y 48 hs).

Durante cada período experimental, los ingredientes de las dietas fueron pesados por separado antes de ser ofrecidos como una ración totalmente mezclada (RTM) de forma individual a cada animal, por mitades luego de cada ordeño, 3:30 a.m. y 2:30 p.m. Las RTM contenían, en base seca, 26,6 % de heno de alfalfa (HF), 30,8 % de silaje de maíz (SM), 41,01 % de una mezcla de concentrado formulado principalmente a partir de grano de maíz molido (GM), harina de soja (HS) de alta proteína y 1,59 % de sales vitamínicas y antiácidas. La PB en la dieta se redujo reemplazando el GM por HS en el concentrado. La composición química de las dietas experimentales se presenta en la Tabla 4.2. La cantidad de alimento ofrecido a las vacas se ajustó diariamente para permitir rechazos equivalentes al 5 a 10% del consumo e la RTM.

**Tabla 4.2.** Ingredientes y composición química de las dietas experimentales ofrecidas a vacas lecheras Holando Argentino en lactancia.

Ítem	Dietas <sup>1</sup>		
	BPB	MPB	APB
<b>Porcentaje en la dieta (% MS)</b>			
Silaje de maíz, %	30,8	30,8	30,8
Heno de alfalfa, %	26,6	26,6	26,6
Grano de maíz (molido), %	38,4	30,3	22,2
Harina de soja, %	2,6	10,7	18,8
Sales mix Mineral-vitamínico	1,3	1,3	1,3
Bicarbonato de sodio	0,3	0,3	0,3
<b>Composición química <sup>2</sup></b>			
MS, %	52,1	52,2	52,3
PB, % de MS	13,0	16,0	19,1
N, % de MS	2,1	2,6	3,1
FDN, % de MS	30,1	29,8	29,6
FDA, % de MS	18,0	18,0	18,0
LDA, % de MS	3,2	3,2	3,3
EE, % de MS	2,6	2,5	2,4
Cenizas % de MS	5,6	6,0	6,4
CNF, <sup>3</sup> % de MS	47,2	44,1	41,0
NDT, <sup>4</sup> % de MS	70,0	69,6	69,3
EM, <sup>4</sup> Mcal/kg	2,4	2,5	2,5
EN <sub>L</sub> , <sup>4</sup> Mcal/kg	1,5	1,6	1,6
PDR, <sup>4</sup> %	8,0	10,0	12,0
PNDR, <sup>4</sup> %	5,0	6,0	7,0
PDR, <sup>4</sup> % de la PB	61,5	62,3	63,0
PNDR, <sup>4</sup> % de la PB	38,5	37,7	37,0

**Referencias:** MS, materia seca, PB, proteína bruta, NIDA, nitrógeno unido a la fibra en detergente neutro, FDN, fibra detergente neutra, FDA, fibra detergente ácido, LDA, lignina detergente ácido, EE, extracto etéreo, CNF, carbohidratos no fibrosos, NDT, nutrientes digestibles totales, EM, energía metabolizable, EN<sub>L</sub>, energía neta para lactación, EB, energía bruta. La mezcla de minerales y vitaminas contenía (por kg de MS): 16,0% Ca, 8,0% P, 4,5% Mg, 1,8% K, 1,0% S, 6,3% Na, 10% de Cl, 2,100 mg Fe. <sup>1</sup> BPB: baja proteína bruta; MPB: media proteína bruta, APB: alta proteína bruta. <sup>2</sup> Estimada a partir de la composición química de los componentes. <sup>3</sup> CNF = 100 - (PB % + FDN % + EE % + cenizas %). <sup>4</sup> Estimado usando el modelo NRC (2001) con datos obtenidos por Daisy II.

MESES	Junio				Julio				Agosto				Septiembre			
FECHAS	15/6	5/7	6/7	15/7	17/7	6/8	7/8	16/8	18/8	7/9	8/8	17/9				
PERIODOS	ADAPTACIÓN		MEDICIÓN		ADAPTACIÓN		MEDICIÓN		ADAPTACIÓN		MEDICIÓN					
Pesaje animales																
Muestras de alimentos																
Muestreo de leche																
Evaluación de eficiencia de conversión de alimento																
Colección de excretas (heces y orina)																
CH <sub>4</sub> (colocación cápsula)																
CH <sub>4</sub> (medición)																
Muestreo de sangre																

**Figura 4.1:** Calendario resumen de etapas y muestreo de ensayo con animales

### 4.2.3. Mediciones, muestreo y análisis

---

Los ingredientes de las dietas fueron muestreados (aprox. 0,5 kg de muestra) semanalmente. Las muestras se secaron a 60°C (horno de aire forzado) durante 48 hs, se molieron para pasar una malla de molino Wiley de 2 mm (Arthur H. Thomas, Philadelphia, PA) y se enviaron al Laboratorio de Forrajes de la Estación Experimental de Rafaela (Rafaela, Santa Fe, Argentina) para su análisis. Antes de cada período experimental, la formulación de las dietas fue ajustada de acuerdo a los resultados de los análisis de los ingredientes.

Durante los últimos 9 días de cada período experimental (día 21-29) se llevó registro del CMS, de forma individual, por diferencia entra la oferta y el rechazo. Los alimentos utilizados para formular las RTM fueron muestreados de forma diaria y al final de la etapa experimental se realizó un pool por alimento por periodo. El alimento rechazado se colectó en su totalidad antes de cada ordeño de la tarde, se pesó, y se tomaron muestras de aproximadamente 500 g en base seca, que fueron conservadas a -18°C hasta su posterior análisis. Las muestras de rechazo de alimento se combinaron por período para cada vaca en base individual. Las muestras compuestas de cada alimento por separado y de los rechazos por animal se secaron a 60°C en estufa de aire forzado durante 48 hs y se molieron para luego ser analizadas. El consumo de agua se registró diariamente de forma inmediata antes de la entrega de la dieta luego del ordeño de la tarde mediante la diferencia entre el agua suministrada y rechazada a lo largo del día en bebederos individuales previamente graduados.

La producción de leche fue medida en forma individual y diaria por un sistema de medición de leche DeLaval ALPRO (DeLaval Internacional AB, Tumba, Suecia). Del día 21 la 24 de cada período experimental, se colectaron muestras de leche correspondientes a cada turno de ordeño (mañana y tarde) utilizando medidores de leche (DeLaval Internacional AB, Tumba, Suecia), para confeccionar una muestra única individual (pool) por día ponderada por la respectiva producción individual. Las mismas fueron recogidas en viales de 100 ml que contenían 2-bromo-2-nitropropano-1-2-diol como conservante y enviadas al Laboratorio de Calidad de la Leche y Agroindustria (Rafaela, Santa Fe, Argentina) para su análisis. Para la determinación de NUL, 5 ml de muestras de leche de ambos ordeños se trataron con 5 ml de TCA 25% (peso/vol).

Del día 21 a 24 se tomaron muestras puntuales de heces de cada vaca 4 veces al día (grab sampling) de aproximadamente 1000 g (fresco). Las heces fueron transferidas a bandejas de aluminio y colocadas en estufa de aire forzado a 60 ° C durante 72 h, se molieron a través de un

tamiz de 1 mm (molino Wiley), y se mezclaron por animal y día hasta su posterior análisis. Durante el mismo período se recogieron muestras puntuales de orina en recipientes de polietileno de 1 L mediante estimulación manual de la vulva después de cada ordeño. Inmediatamente después de la recolección, las muestras de orina se diluyeron mezclando 15 ml de orina con 60 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,072 N y se almacenaron a -20°C hasta su análisis.

Por último, se tomaron muestras de sangre de la vena coccígea luego de cada ordeño (am y pm) del día 24. Las muestras se recogieron en viales preparados con litio-heparina y el plasma se obtuvo por centrifugación (2000 × g durante 15 minutos en 4°C) y se almacenó en -24°C hasta el análisis.

La eficiencia de la conversión de MS de alimento (PL/CMS) se calculó para cada vaca durante los últimos 9 días de cada período dividiendo la producción promedio de leche por el CMS. De manera similar, se calculó la EUN (asumiendo que no haya retención o movilización del N corporal) dividiendo la producción media de N en leche (proteína verdadera de leche/6,38) por el consumo de N. Para la evaluación del cambio en el PV, los animales fueron pesados 2 días consecutivos al comienzo del ensayo y al final de cada período. Lo mismo fue realizado para el cambio en la CC.

Todas las muestras de alimentos, rechazos y heces se analizaron para determinar el N total (AOAC, 1998, método 976.05), MS analítica a 100°C durante 24 h, cenizas (AOAC, 1990, método 130.15 y 167.03), extracto etéreo (EE; AOAC, 1999, método 920.39), lignina (LDA; ANKOM, 2005), FDN y FDA secuencialmente utilizando según Van Soest *et al.* (1991) y adaptado para Ankom 200 Fiber Analyzer (Ankom Technology, Fairport, NY) basado en ISO 13906: 2008 y FDA indigestible (FDA restante después de 12 días de incubación *in situ* (Huhtanen *et al.*, 1994). La FDA indigestible se utilizó como un marcador interno para estimar la digestibilidad aparente de los nutrientes y el volumen fecal (Cochran *et al.*, 1986). La MO se calculó como la diferencia entre los contenidos de MS y de cenizas. Los CNF se calcularon de acuerdo con NRC (2001) usando los valores de PB, FDN, EE y cenizas. La composición química de las dietas se calculó a partir de los análisis de laboratorio y de las proporciones de los distintos ingredientes en la dieta. Además, se utilizó NRC (2001) para predecir características de las dietas seleccionadas (PDR, PNDR y celulosa). Para la predicción de PDR y PNDR, se utilizaron los valores obtenidos mediante Daisy II, para cada uno de los alimentos por separado.

En las muestras de leche se analizó grasa butirosa (GB), proteína bruta en leche (PBL) y

verdadera (PV), lactosa y sólidos no grasos (SNG) por análisis infrarrojo (Milko-Scan™ Minor, FOSS Electric, Hilleroed, Denmark) de acuerdo con ISO 9622: IDF 141 (2013). NUL, caseína y el recuento de células somáticas (RCS) fueron analizadas utilizando el método infrarrojo en un analizador Dairy Spec 150 combi (Bentley Instruments, Chaska, MN). La estimación del recuento de microorganismos mesófilos aerobios viables (RBT) fue realizada utilizando el Bactoscan (Bentley Instruments, Chaska, MN). El nitrógeno total (NT) y el nitrógeno no proteico (NNP) se determinaron mediante Kjeldahl (Kjeltec Auto, FOSS Electric, Hilleroed, Denmark) de acuerdo con ISO FDIS 8968-3 (IDF 20-3: 2004).

Las muestras de orina fueron descongeladas y analizadas para N total (AOAC, 1998; método 976.05), urea (cinética UV) y creatinina (método colorimétrico Jaffé). El volumen diario de orina y la excreción de urea N y el N total se estimaron a partir de la concentración urinaria de creatinina, suponiendo una tasa de excreción de creatinina de 29 mg/kg de peso corporal (Valadares *et al.*, 1999). En el caso de las muestras de sangre, el suero se decantó e inmediatamente se analizó glucosa (Enzymatic blood glucose, Wiener Laboratory, Rosario, Argentina) y urea (Uremia, Wiener Laboratory, Rosario, Argentina).

#### **4.2.4. Medición de metano entérico**

---

La emisión de CH<sub>4</sub> se midió utilizando la técnica de trazado con hexafluoruro de azufre (SF<sub>6</sub>; Johnson *et al.*, 1994). Diez días antes del comienzo del ensayo, se colocó en el rumen de cada animal una cápsula SF<sub>6</sub> con una tasa de emisión de SF<sub>6</sub> conocida (Grupo de Físico-química Ambiental, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad del Centro de la Provincia de Buenos Aires). En promedio, las tasas de permeación fueron 4,90 ± 1 mg SF<sub>6</sub>/día. El sistema de muestreo de gases expirados por el animal consistió en 2 recipientes colectores de acero inoxidable de 0,5 litros en vacío (recipiente), restrictores de flujo de entrada -calibrados para acumular 0,5 bar de muestra de aire durante un período de 5 días- y un tubo conector (Gere, 2012). El restrictor de entrada estaba ubicado justo encima de las fosas nasales del animal y protegido contra el agua y el polvo por medio de un filtro doble (Gere y Gratton, 2010). Dos tubos de recolección se colocaron en la cabeza de cada animal por medio de arneses especialmente diseñados. Inmediatamente antes del período de muestreo, cada tubo de recolección se evacuó (< 0,5 mb) después de limpiar con gas N<sub>2</sub> de alta pureza (Dini *et al.*, 2012). Muestras del gas exhalado/eructados se colectaron continuamente durante cinco días consecutivos en cada período de mediciones (días 25 a 29). Además, tubos idénticos a los utilizados con las vacas fueron distribuidos en los corrales para

colectar muestras de aire del ambiente durante los cinco días de cada período. Las muestras de gas recolectadas se analizaron inmediatamente después del final de cada período experimental mediante un cromatógrafo GC Agilent, 7890A. Las emisiones diarias de CH<sub>4</sub> se calcularon a partir de la tasa de emisión de SF<sub>6</sub> de cada cápsula intraruminal y de la relación CH<sub>4</sub>/SF<sub>6</sub> de las concentraciones en las muestras de aire, luego de descontar las concentraciones de gases en el ambiente (Johnson *et al.*, 1994).

#### 4.2.5. Comparación económica

---

En la Tabla 4.3 se presentan los precios medios para cada ingrediente abonados en el tambo experimental durante el transcurso del ensayo (junio a septiembre de 2017). Estos precios se utilizaron para calcular los costos de las 3 dietas, en dólares estadounidenses (USD; USD/kg MS; y de la ración diaria consumida (USD/día)) con un dólar promedio de 16,12 ARS. El ingreso sobre el costo del alimento (ISCA) se calculó restando el costo de la dieta del ingreso bruto de la producción de leche (Corea *et al.*, 2017) utilizando el precio promedio de la leche recibido durante el ensayo (0,343 USD/kg).

**Tabla 4.3.** Precios medios para cada ingrediente utilizado en las dietas experimentales (expresado en valor dólar estadounidense/kg MS).

<b>Alimento</b>	<b>USD/kg MS</b>
Silaje de maíz	0,08
Heno de alfalfa	0,12
Grano de maíz	0,19
Harina de soja	0,32
Sales mix	0,50

Finalmente, se valoró económicamente para cada tratamiento, la externalidad negativa relacionada a la excreción de N al ambiente. Para esto, se realizaron dos evaluaciones. Por un lado, se determinó el costo potencial de la lixiviación de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. La cantidad de N potencial que se perdería de forma de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> se estimó a través del modelo propuesto por Beukes *et al.* (2012). Con el objetivo de aplicarle un valor a la cantidad de N potencialmente lixiviado, se aplicó el valor de referencia nacional de urea (465 USD/tn; YPF abril 2019). Por otro lado, se estimó la pérdida de N en forma de N<sub>2</sub>O a la atmósfera a través de la estimación de la cantidad de CO<sub>2</sub> equivalente (*Tier 2*; IPCC, 2006) y se lo multiplicó por la cotización de la tonelada de CO<sub>2</sub> en el mercado de bonos

de carbono. Se consideraron los precios de permisos de emisiones de CO<sub>2</sub> emitidos por la Unión Europea (European Union Allowances - EUA), dado que es el mercado de mayor importancia en este sector. Para realizar los cálculos, se utilizó el precio al 23 de abril del 2019 (27,42 € = 30,98 USD).

#### 4.2.6. Análisis estadístico

---

Durante el período 2, uno de los animales experimentales fue sacado del ensayo debido a mastitis.

Los datos se analizaron usando PROC MIXED de SAS (SAS studio Institute, 2003, SAS Inst. Inc., Cary, NC). Para el análisis estadístico se utilizaron los valores promedio de cada periodo. El efecto del período de muestreo y la secuencia se analizaron para evaluar la existencia del efecto residual (*carry over*), pero no fueron significativos para ninguna de las variables. Todos los datos, fueron analizados de acuerdo al siguiente modelo:

$$Y_{ij} = \mu + \pi_i + \beta_j + T d(i, j) + Y d(i-1, j) + \varepsilon_{ij},$$

donde  $Y_{ij}$  denota la variable de respuesta para el sujeto  $j$  en el período  $i$ ,

$\mu$  es una media general,

$\pi_i$  y  $\beta_j$  denotan el efecto período y animal, respectivamente,

$d(i, j)$  denota el efecto tratamiento para el sujeto  $j$  en el período  $i$ ,

$T d(i, j)$  es el efecto del tratamiento (directo) para ese tratamiento,

$Y d(i-1, j)$  es el efecto residual para el animal  $j$  del tratamiento al que fuera expuesto en el período anterior.

Los residuos fueron probados para su distribución normal por PROC UNIVARIATE y para las tendencias por trazado contra los valores predichos. Los resultados se presentan como medias con error estándar de diferencia y se realizaron contrastes lineales y cuadráticos de grado único de libertad.

Las diferencias significativas se declararon a  $P \leq 0,05$ . Cuando el efecto principal del tratamiento fue significativo, las diferencias entre medias se analizaron mediante una prueba t por pares (opción diff de PROC MIXED).

## 4.3. RESULTADOS Y DISCUSION

### 4.3.1. Características de las dietas

---

La composición química de los ingredientes de la dieta se presenta en la Tabla 4.1 y la composición de las RTM en la Tabla 4.2. La variación mínima en el contenido de PB de todos los ingredientes de la dieta hizo posible mantener concentraciones de PB constantes durante todo el ensayo. Las concentraciones de PB de las RTM promediaron 13,0, 16,0 y 19,1% MS, y así se logró, en promedio, la diferencia inicialmente prevista de 3 unidades porcentuales entre los tratamientos. Los contenidos de FDN y FDA de las dietas fueron similares entre los tratamientos y cumplieron con los recomendados por el NRC (2001).

Debido a que las dietas de los diferentes tratamientos se formularon reemplazando la harina de soja con alto contenido de PB) por grano de maíz molido, la reducción en el contenido de PB entre tratamientos fue acompañada por un leve aumento en el contenido de CNF, siendo para el tratamiento con bajo contenido de PB dietario superiores a los recomendados por el NRC (2001) (45% de la MS). Sin embargo, la variación del contenido de EN<sub>L</sub> predicho fue mínima, logrando valores similares entre tratamientos. Además, en base al CMS obtenido en cada tratamiento, la producción de leche en base al contenido de EN<sub>L</sub> predicha por NRC (2001) fue de 37,2; 36,7 y 36,3 kg/d, y por PM fue de 43,2; 39,0 y 28,5 kg/d para las dietas con 19,0, 16,0 y 13,0% de PB, respectivamente, lo que sugiere que la dieta de 13 %PB pudo haber limitado el aporte de proteína, pero no el de energía.

### 4.3.2. Consumo y digestibilidad aparente.

---

No se observaron diferencias significativas en el CMS entre tratamientos ( $P = 0,45$ ), el cual en promedio fue de  $23,8 \pm 0,11$  kg MS/animal/día. Lo mismo observaron Colmenero y Broderick (2006) en vacas en lactancia temprana y media, Cunningham *et al.* (1996) y Leonardi *et al.* (2003), quienes detectaron poco efecto del contenido de PB en la dieta sobre el CMS. Al mismo tiempo, no se observaron diferencias en el consumo de MO ( $P = 0,07$ ), FDN ( $P = 0,71$ ) ni tampoco FDA ( $P = 0,19$ ). Sin embargo, sí hubo diferencias con respecto a la excreción de FDN y FDA (Tabla 4.4) entre los tratamientos extremos, siendo menor la excreción para el menor nivel de PB, generando diferencias significativas en el flujo de ambos y por lo tanto en la digestibilidad

aparente. Con respecto a la digestibilidad de la MS (DMS), no se observaron diferencias significativas entre tratamientos ( $P = 0,43$ ). Situación similar observó Castillo *et al.* (2001) y Wattiaux y Karg (2004), donde la DAMS fue alta y no se vio afectada por los tratamientos, cuando la PB de la dieta aumentó. Groff y Wu (2005) tampoco observaron cambios consistentes en la DMS según el nivel de PB. Con respecto a la digestibilidad de la MO (DMO), tampoco se encontraron diferencias significativas entre tratamientos ( $P = 0,55$ ) al igual que Cunningham *et al.* (1996) e Ipharraguerre *et al.* (2005). Sin embargo, existió una tendencia hacia un mayor consumo de MO a medida que disminuyó el nivel de PB de la dieta ( $P = 0,07$ ), corroborado por la existencia de una respuesta lineal en dicho componente ( $P = 0,03$ ).

En el caso de la digestibilidad de la FDN (DFDN) y FDA (DFDA) existieron diferencias significativas entre los tratamientos ( $P = 0,02$  y  $P < 0,001$  respectivamente), con una disminución lineal ( $P = 0,005$  y  $P < 0,001$ , respectivamente) en respuesta a un aumento en la PB en la dieta (Tabla 4.5). Contrariamente, Cunningham *et al.* (1996) observaron aumentos lineales en el consumo de FDN y FDA al aumentar el contenido de PB de la dieta de 14,4 a 16,4 y 18,4%, pero sin efectos sobre la digestibilidad ruminal de la fibra o la MO. Christensen *et al.* (1993) no detectaron mejoría en el consumo o la digestibilidad aparente de la MO, FDN y FDA al aumentar el contenido de PB de la dieta de 16,4 al 19,6%. Groff y Wu (2005), en vacas alimentadas con dietas con distintas proporciones de silaje de alfalfa o de maíz, observaron que la DFDA no se vio afectada por el contenido de proteína en la dieta en raciones con 100% silaje de alfalfa como fuente de forraje, pero se incrementó linealmente a medida que aumentó el contenido de PB en aquellos tratamientos con 50% o mayor proporción de silaje de maíz.

La digestibilidad de la PB (DPB) mostró una respuesta contraria a la fibra, observándose un aumento lineal y cuadrático en respuesta a una mayor PB de la dieta ( $P < 0,001$ ), al igual que lo observado por Colmenero y Broderick (2006). Sin embargo, Groff y Wu (2005), en base a distintos trabajos publicados, concluyen que el efecto del contenido de PB en la dieta sobre la DPB no es consistente. En algunos casos la disminución de PB en la dieta resultó en una menor DPB (Wright *et al.*, 1998; Kauffman y St-Pierre, 2001; Broderick, 2003; Wattiaux y Karg, 2004) y en otros casos no se observaron cambios (Noftsgger y St-Pierre, 2003).

#### **4.3.3. Producción y composición de la leche.**

---

Según Broderick (2003), el aumento del consumo de N no siempre conduce a un mejor desempeño de la lactancia, especialmente en los niveles más altos de PB consumida. Cunningham

*et al.* (1996) y Leonardi *et al.* (2003) no observaron ningún efecto del contenido de PB en la dieta sobre la PL en vacas lecheras cuando la PB en la dieta aumentó de 16,5 a 18,5 % y de 16,1 a 18,9 %, respectivamente. Según Lee *et al.* (2012), las dietas bajas en PB pueden estimular el reciclaje de urea y proporcionar PDR adicional a los microorganismos del rumen cuando el suministro de PDR en la dieta es bajo. Sin embargo, las dietas deficientes en PM y PDR, pueden resultar en una disminución de la PL (Cressman *et al.*, 1980; Wu y Satter, 2000; Frank y Swensson, 2002; Cabrita *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2011). No obstante, estos resultados no concuerdan con lo observado en el ensayo en discusión, donde la producción de leche (PL) aumentó linealmente ( $P < 0,001$ ) al aumentar el suministro de PB (Tabla 4.5), observándose un aumento de 2,26 kg/día (7,5%) al aumentar de 13 a 16% PB en la dieta, 2,52 kg/día (7,8%) al aumentar de 16 al 19% PB y un total de 4,78 kg/día y 15,9 % al aumentar el contenido de PB de 13 a 19 %. La misma respuesta lineal se obtuvo para el caso de la producción de leche corregida por energía (LCE), por grasa (LCG) y por grasa y proteína (LCGP) ( $P < 0,001$ ). Estos resultados concuerdan con los de Barros *et al.* (2017), quienes observaron un incremento de 9,7 % al aumentar el contenido de PB de 13,1 a 16,2%, e Ipharraguerre y Clark (2005), quienes informaron una disminución de 9,0% en la PL de cuando vacas de 15 a 112 DEL fueron alimentadas con una dieta de 14,8 % PB en comparación con una 18,5% PB. Los trabajos nombrados anteriormente y el de Colmenero y Broderick (2006) son consistentes con el patrón mostrado en las bases de datos del NRC (2001) y las revisiones de Huhtanen y Shingfield (2005) e Ipharraguerre y Clark (2005), que indican que la PL aumentó, pero a una tasa decreciente, al aumentar el contenido de PB en la dieta, caso contrario a lo observado en los resultados de este ensayo.

La producción de leche por kg de MS consumida (PL/CMS) aumentó de forma lineal ( $P < 0,001$ ) al aumentar el contenido de PB (Tabla 4.5). Una variación en la CC podría indicar un cambio de destino de los nutrientes. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en dicha variable, al igual que diferencias en el PV. Dicho resultado concuerda con lo observado por Broderick (2003), Colmenero y Broderick (2006) y Barros *et al.* (2017), quienes no encontraron efectos de dietas con un amplio rango de concentraciones de PB, sobre el PV. Con respecto a la calidad de la leche, los tratamientos no afectaron el porcentaje GB ( $3,76 \pm 0,28$ ), pero el porcentaje de PBL ( $3,76 \pm 0,28$ ) aumentó de forma lineal ( $P < 0,001$ ) al incrementarse la PB de la dieta, observándose diferencias significativas entre los tratamientos extremos (Tabla 4.5). Sin embargo, la producción (kg/día) de GB y PBL fueron diferentes entre tratamientos ( $P < 0,001$ ). Ello se debe a la diferencia obtenida en PL, permitiendo un aumento en forma lineal ( $P < 0,001$ ) en respuesta a un mayor contenido proteico de la dieta, similar a lo observado por Acharya *et al.* (2015),

quienes informaron un aumento en la producción de leche y la producción de GB cuando la PB en la dieta aumentó de 14,3% a 16,3%, y para el caso de la PBL, el aumento se relacionó no solo con un aumento en la PL, sino también con un aumento en el contenido (%) de PBL. Cabrita *et al.* (2011) también informaron una disminución en el rendimiento de PBL con una PB en la dieta decreciente (de 15,7 a 14,3% de la MS). Según Barros *et al.* (2017), la diferencia entre los tratamientos puede ser el resultado de diferentes mecanismos subyacentes que dependen de la severidad de la reducción en la PB de la dieta. Tanto Leonardi *et al.* (2003) como Niu *et al.* (2016) no encontraron una reducción significativa en el contenido de PBL de 3,25% a 3,18% y de 3,11% a 3,10%, respectivamente, a medida que el nivel de PB de la dieta aumentó ( $P = 0,80$ ). El contenido de lactosa promedió  $4,85 \pm 0,16$  % y tampoco se vio afectado por los tratamientos ( $P = 0,25$ ). Sin embargo, la producción de lactosa disminuyó de forma lineal ( $P < 0,001$ ) al disminuir la PB de la dieta, debido a la menor PL. Con respecto a los SNG, el porcentaje ( $8,76 \pm 0,17$  %) no varió entre tratamientos ( $P = 0,24$ ) y fue cercano a los valores (8,96 % promedio) reportados tanto en Broderick (2003) como en Colmenero y Broderick (2006) y menores a los observados por Barros *et al.* (2017).

#### **4.3.4. Utilización y destino del nitrógeno consumido.**

---

Los datos del balance de N corporal total se presentan en la Tabla 4.6. El consumo de N total (CN) aumentó linealmente con el incremento del contenido de PB en la dieta. Las vacas alimentadas con el tratamiento MPB consumieron 112 g/día (22,5 %) más de N total que las BPB y las APB 114 g/día (18,7%) más de N que las MPB y 226 g/día (45,4 %) más de N total que las BPB.

La excreción de N en orina y heces en conjunto aumentó de forma lineal ( $P < 0,001$ ) a medida que aumentó la PB de la dieta: 50,6% a 65,9% del CN en los tratamientos BPB y APB, respectivamente. En vacas lecheras alimentadas con dietas con niveles de PB de 15,2 y 18,5 %, Niu *et al.* (2016) reportaron magnitudes de excreción similares. Kidane *et al.* (2016) observaron un aumento del N excretado al incrementarse el contenido de PB de la dieta de 17,5 % a 13,0 %, lo cual está de acuerdo con otros informes como en el caso de Colmenero y Broderick, 2006; Powell *et al.*, 2008; Powell *et al.*, 2010 y Rendon-Huerta *et al.*, 2014. Castillo *et al.* (2001), de una extensa revisión de estudios publicados, informaron que, en promedio, el 72% del N consumido por las vacas lecheras se excreta en heces y orina y que existe una relación lineal entre el consumo de N y N excretado en heces (NH) y orina (NOr).

El volumen de orina, la excreción de NOr y la excreción de N ureico en orina (NUOr) aumentaron significativamente en respuesta al contenido de PB en la dieta ( $P < 0,001$ ). El volumen de orina aumentó de 32,7 a 37,3 L/día en respuesta a un mayor consumo de PB, al igual que lo observado por Sannes *et al.* (2002). El volumen de orina producido es un determinante principal de la concentración de N en la orina, tanto en situaciones de restricción de agua como de aumento del consumo de agua (Spek *et al.*, 2013). En el presente estudio, el consumo de agua aumentó de forma lineal ( $P = 0,002$ ) a medida que el CN aumentó (Tabla 4.6). Según Dijkstra *et al.* (2013), las concentraciones de N en orina, plasma y leche varían con el consumo de minerales y agua y según Van Vuuren y Smits, (1997), los animales alimentados con niveles altos de PB en la dieta, consumen más agua y, por lo tanto, excretan más orina. Dicha respuesta estaría indicando una necesidad de eliminar mayor volumen de orina para extraer el exceso de N consumido por las vacas (Holter *et al.*, 1982; Barros *et al.*, 2017). A medida que se incrementó el CN, la cantidad de N excretado en orina aumento en forma lineal ( $P < 0,001$ ) y cuadrática ( $P = 0,005$ ), incrementándose en un 73,75 % (89 g/día) para el caso e MPB en comparación con BPB y en un 51,86 % (109 g/día) para el caso de APM en comparación con MPB, representando un aumento del 163,97 % (198 g/día) más de N excretado en orina para APB con respecto a BPB. Lo mismo fue observado para el caso de la proporción de N consumido que fue excretado en la orina, la cual aumentó en forma lineal ( $P < 0,001$ ) a medida que el contenido de PB de la dieta aumentó y la cual se vio casi duplicada en el caso de APB con respecto a BPB.

Los resultados del presente trabajo muestran que el N consumido por sobre el observado en la dieta con 13% de PB, se excretó principalmente como urea en orina. La proporción de NUOr aumentó en forma lineal ( $P = 0,004$ ) en función del mayor CN, pasando de 38,8 % en BPB a 52,30 % para el caso de APB. Barros *et al.* (2017) también observaron que el 55,4% del total de N en orina fue excretado en forma de urea en dietas con 19,4% de PB. La urea contribuye a la osmolaridad de la orina, que determina el volumen de orina (Appuhamy *et al.* 2014). Este hecho es interesante debido a que el NUOr es la principal fuente de emisiones de  $\text{NH}_3$  y  $\text{N}_2\text{O}$  de las excretas en vacas lecheras (Powell *et al.*, 2014). Cualquier intervención que permita disminuir la excreción de N ureico en orina redundará en una disminución del impacto ambiental de la producción.

A diferencia de Castillo *et al.* (2001), pero semejante a lo reportado por Hynes *et al.* (2016) y Dickhoefer *et al.* (2018), en el presente estudio la excreción de N en heces (NH; g/día) mostró una respuesta lineal ( $P < 0,001$ ) y una tendencia a cuadrática ( $P = 0,07$ ) al aumentar en función del

aumento de la PB de la dieta. Sin embargo, expresada como porcentaje del N consumido la excreción de NH fue similar entre tratamientos.

Castillo *et al.* (2001) sugirieron que una reducción en la PB de la dieta de 19,0 a 15,0% de la MS reduciría la excreción de NOr, sin alterar significativamente la producción de leche. Sin embargo, en este estudio, la PL y la producción de PBL se vieron afectadas por los niveles de PB de la dieta, observándose la misma tendencia lineal ( $P < 0,0001$ ) en respuesta a la PB de la dieta la secreción de N en leche (Tabla 4.6). No obstante, expresada como porcentaje del N consumido, esta tendencia se revirtió, al igual que lo ocurrido con el NH. Estos resultados si corresponden a lo observado por Castillo *et al.* (2001), quienes concluyeron que por encima de los 400 g/día de N consumido, la proporción de N excretado en la orina aumentó exponencialmente, mientras que la eliminación proporcional de N en heces y leche disminuyó de manera lineal.

A medida que el CN aumentó, la eficiencia en el uso del N (EUN; g de leche N por g de N consumido) disminuyó linealmente ( $P < 0,001$ ) del 29,4% al 24,5% (Tabla 4.6), para APB con respecto a BPB, respectivamente. Estos resultados concuerdan con los de diferentes estudios que reportaron menores EUN en vacas lecheras en lactancia en respuesta a mayores CN (e.g., Castillo *et al.*, 2000; Broderick, 2003; Dijkstra *et al.*, 2013; Niu *et al.*, 2016; Barros *et al.*, 2017; Kidane *et al.*, 2018; Dickhoefer *et al.*, 2018). El aumento de PB de 13,01 a 16,04% redujo la EUN en 2,8 unidades porcentuales. Dicha magnitud de cambio es similar a lo observado por Hristov *et al.* (2004) y Colmenero y Broderick, (2006) y menor a lo observado por Kidane *et al.* (2018). Dado que, a menor consumo de N, mayor es la eficiencia de su uso (Huhtanen y Hristov, 2009), manipular el nivel de PB en la dieta permitiría mejorar la EUN y minimizar las pérdidas de N al ambiente (Castillo *et al.*, 2000; Sinclair *et al.*, 2014).

En el presente estudio, los cambios en las concentraciones de urea en leche (NUL), indicador ampliamente estudiado como una herramienta para estimarla EUN, reflejaron los cambios en el CN (Tabla 4.6), observándose diferencias significativas entre los 3 tratamientos ( $P < 0,001$ ) y un aumento lineal ( $P < 0,001$ ) a medida que la PB de la dieta aumentó, con un aumento en promedio de  $1,37 \pm 0,11$  mg/dL por unidad de PB agregada en la dieta. Este último valor es cercano al obtenido por Ipharraguerre y Clark (2005), Colmenero y Broderick (2006) y Barros *et al.* (2017).

Los cambios en los valores de NUL fueron los esperados y mostraron la misma tendencia que los reportados por Spek *et al.* (2013), Mutsvangwa *et al.* (2016), Corea *et al.* (2017), Barros *et al.* (2017) y Chen *et al.* (2018). En base a los valores actualmente recomendados de NUL por Chase

(2007) y Spek *et al.* (2013), el tratamiento BPB estuvo en el rango de valores más deseable (entre 9 y 12 mg / dL), indicando un consumo de N de acuerdo a lo recomendado (Nousiainen *et al.*, 2004; Kohn, 2007; Spek *et al.*, 2013), los tratamientos BPB y MPB estuvieron en el rango de buena EUN, existiendo oportunidades para mejorarla. Aquellos valores por encima de los 12 mg/dL ya suelen indicar un nivel bajo de EUN y una alta excreción de NUOr (Hutjens y Chase, 2012). En el caso del tratamiento APB, los valores observados fueron superiores a los 15 mg/dL indicando un exceso de PB en la dieta. Al mismo tiempo, los valores de EUN de APB estuvieron en el rango de valores de EUN baja (< 25 %), lo cual significa que se requiere realizar cambios en la dieta para poder mejorar la EUN. Sin embargo, cabe aclarar que BPB estuvo cercano al valor a partir del cual se considera una EUN muy buena (entre 30-35 %).

Los valores de NUL estuvieron correlacionados con los de NUS ( $r = 0,80$ ), de acuerdo con previos reportes (Wheadon *et al.*, 2014; Cantalapiedra-Hijar *et al.*, 2015). Las altas concentraciones de NUS, producto final del metabolismo del N, son indicativos de un uso ineficiente de la PB de la dieta por parte de las vacas lecheras (Broderick y Clayton, 1997; Colmenero y Broderick, 2006). En el presente estudio, el NUS aumentó de 13,4 a 38,3 mg / dL, observándose una respuesta lineal ( $P < 0,001$ ), una tendencia a una respuesta cuadrática ( $P = 0,06$ ) con contenido de PB de la dieta. Los valores de glucosa en sangre fueron cercanos a 60 mg/dL (59,8 mg / dL promedio) y no se observaron diferencias significativas entre tratamientos.

#### **4.3.5. Emisión de metano entérico.**

---

Manipular la composición de nutrientes de las dietas para rumiantes es una de las opciones para reducir las emisiones de CH<sub>4</sub> sin disminuir la producción animal (Grainger y Beauchemin, 2011). Sin embargo, los resultados son a menudo complejos y variables. La emisión de CH<sub>4</sub> (Tabla 4.6), fue similar entre tratamientos ( $P = 0,92$ ). Lo mismo ocurrió con la emisión de CH<sub>4</sub> en relación al CMS, al PV y a la intensidad de emisión (g CH<sub>4</sub>/ kg PL).

La emisión de CH<sub>4</sub> promedio fue de  $531 \pm 66$  g CH<sub>4</sub>/vaca/día. Estos valores son comparables a los reportados por Aguerre *et al.* (2011), Arndt *et al.* (2015), Edouard *et al.* (2016) y Kidane *et al.* (2018), los cuales fueron 592, 467, 577, 474 gCH<sub>4</sub>/día respectivamente, pero superiores a los publicados por y Hindrichsen *et al.* (2006), Odongo *et al.* (2007), Beauchemin *et al.* (2009), Holtshausen *et al.* (2009) y Hassanat *et al.* (2013) y Niu *et al.* (2016) (387, 444, 266, 452 y 415 gCH<sub>4</sub>/día, respectivamente). La emisión de CH<sub>4</sub> promedio por kg de MS y PV fue de  $22,3 \pm 2,9$  gCH<sub>4</sub>/kg MS consumida y  $0,83 \pm 0,11$  g CH<sub>4</sub>/kg PV, y la intensidad de emisión fue de

16,5 ± 2,79 gCH<sub>4</sub>/kg de leche producida.

Bannink *et al.* (2010) reportaron que las emisiones de CH<sub>4</sub> entéricas observadas disminuyeron con un aumento en la relación N: MO en la dieta. Sin embargo, en la mayoría de los trabajos publicados no se reportó la existencia de una relación entre la cantidad de proteína total o digestible consumida con las emisiones de CH<sub>4</sub> entérico (Podesta *et al.*, 2013). Niu *et al.* (2016) y Kidane *et al.* (2018) consideran que el contenido de PB en la dieta generalmente no se considera como un factor de importancia con respecto a la emisión de CH<sub>4</sub>.

Según los resultados obtenidos en el ensayo en discusión, la emisión de CH<sub>4</sub> entérico no se vio afectada por la disminución del contenido de PB en la dieta, al igual que la tasa de conversión de CH<sub>4</sub> ( $Y_m$ ), es decir, la energía perdida como CH<sub>4</sub> expresada como fracción de EB consumida ( $P = 0,401$ ). El valor obtenido de dicha variable fue de  $6,82 \pm 0,89$ , el cual se encuentra dentro de los rangos determinados por el IPCC (2006) para vacas en lactancia ( $6,5 \pm 1,0 \%$ ). Sin embargo, se debe tener en cuenta la existencia de una alta variabilidad observada entre animales.

#### **4.3.6. Parámetros económicos.**

---

Con respecto a los indicadores económicos, se observaron diferencias significativas en casi todas las variables evaluadas (Tabla 4.7). Por un lado, el costo de la ración fue mayor a medida que aumentó el porcentaje de PB de la dieta ( $P < 0,001$ ). Ello se debe a que el alimento proteico utilizado fue el de mayor costo unitario de la ración. Dichos costos fueron menores a los observados por Corea *et al.* (2017), donde representaron casi el doble por animal (6,11 USD/vaca). Esta situación permitió obtener una mayor tasa de ingreso sobre el costo de la ración a la obtenida en dicho trabajo.

El aumento de la PB de la dieta y, por lo tanto, la obtención de una mayor PL, permitió un mayor ingreso por vaca ( $P < 0,001$ ), un mayor rendimiento de leche libre de ración ( $P < 0,001$ ) y un mayor margen bruto (ISCA; ingreso menos el costo de la alimentación;  $P < 0,001$ ). No obstante, no se observaron diferencias significativas en el costo de la ración, al ser evaluado como porcentaje de los ingresos ( $P = 0,13$ ).

En este trabajo, con el aumento de la PB de la dieta, la excreción de N total y N en forma de urea aumentó, generando mayor riesgo de lixiviación de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> y de volatilización NH<sub>3</sub> y de N<sub>2</sub>O. Por lo tanto, el costo potencial de la lixiviación de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> fue mayor a medida que aumentó el

porcentaje de PB de la dieta ( $P < 0,001$ ). El costo potencial por la cantidad de  $N_2O$  que se emitiría a la atmósfera en forma de  $CO_2eq$ , también difirió entre tratamientos ( $P < 0,001$ ), observándose la misma respuesta que para el caso del N lixiviado.

Si bien en la actualidad, la industria lechera de Argentina no está obligada a pagar por sus emisiones de GEI o por la contaminación de fuentes de agua con  $NO_3^-$ , es posible que en un futuro cercano existan impuestos sobre dichas variables. Por lo tanto, si bien hoy en día el margen bruto del productor lechero no es afectado por las externalidades negativas sobre el impacto ambiental, dichas evaluaciones son necesarias para comenzar a tomar conciencia de las mismas.

#### **4.4. CONCLUSIONES**

El contenido de proteína en la dieta es el factor más importante que determina la eficiencia en el uso del N, y en consecuencia la excreción de N al ambiente (Powell *et al.*, 2011; Hristov y Giallongo, 2014). Si bien con consumos de materia seca y materia orgánica digestible similares, el aumento del contenido de PB en la dieta resultó en un incremento en la producción de leche y en el contenido y excreción de proteína en leche. Sin embargo, la eficiencia de uso del N de la dieta disminuyó debido a que la excreción de N al ambiente en excretas, sobre todo en orina, la cual se duplicó. Un mayor consumo de N en la dieta, implicó una mayor pérdida de N en forma de urea a través de la orina, lo que llevaría a un aumento de las emisiones de  $NH_3$  y  $N_2O$ .

Dicha pérdida en eficiencia tiene muchos alcances. Por un lado, la proteína de la dieta es un recurso costoso, el cual, cuando es entregado en exceso, es desaprovechado. Por el otro lado, puede tener un impacto ambiental no deseado, a través de las emisiones de N a la atmósfera. Sin embargo, con respecto a la emisión de  $CH_4$  entérico, el contenido de proteína en la dieta no afectó a la emisión de dicho GEI por animal, como así tampoco a la intensidad de emisión de  $CH_4$ . Estos resultados demuestran que la optimización del contenido de PB deberá ser un balance entre los impactos económicos y ambientales en la producción de leche.

**Tabla 4.4.** Consumo, excreción y digestibilidad aparente de los nutrientes en vacas que consumieron dietas con bajo, medio o alto nivel de proteína bruta (valores medios (error estándar)).

Ítem	Dietas <sup>1</sup>			Contrastes <sup>2</sup>				
	BPB	MPB	APB	Trat	P	S	L	Q
<b>Consumo, <sup>3</sup>kg / día</b>								
MS	23,88 (0,12)	23,73 (0,12)	23,69 (0,13)	NS	NS	NS	NS	NS
MO	22,50 (0,11)	22,28 (0,11)	22,16 (0,12)	+	NS	NS	*	NS
PB	3,11 (0,02) <sup>a</sup>	3,81 (0,02) <sup>b</sup>	4,52 (0,02) <sup>c</sup>	***	NS	NS	***	NS
FDN	6,30 (0,03)	6,28 (0,04)	6,27 (0,04)	NS	NS	NS	NS	NS
FDA	3,73 (0,03)	3,69 (0,03)	3,71 (0,04)	NS	NS	NS	NS	NS
<b>Excreción, <sup>4</sup>kg/día</b>								
MS	6,03 (0,07)	5,95 (0,08)	6,07 (0,08)	NS	NS	NS	NS	NS
MO	5,15 (0,07)	5,00 (0,07)	4,99 (0,07)	NS	NS	NS	NS	NS
PB	0,82 (0,01) <sup>a</sup>	0,89 (0,01) <sup>b</sup>	0,98 (0,01) <sup>c</sup>	***	NS	NS	***	NS
FDN	2,72 (0,05) <sup>a</sup>	2,83 (0,06) <sup>ab</sup>	2,95 (0,06) <sup>b</sup>	*	NS	NS	**	NS
FDA	1,57 (0,02) <sup>a</sup>	1,69 (0,02) <sup>b</sup>	1,69 (0,02) <sup>b</sup>	**	NS	NS	**	NS
<b>Digestibilidad aparente del tracto total, <sup>5</sup>%</b>								
MS	74,74 (0,29)	74,93 (0,31)	74,41 (0,31)	NS	NS	NS	NS	NS
MO	77,10 (0,30)	77,55 (0,32)	77,48 (0,32)	NS	NS	NS	NS	NS
PB	73,56 (0,23) <sup>a</sup>	76,82 (0,24) <sup>b</sup>	78,14 (0,24) <sup>c</sup>	***	NS	NS	***	***
FDN	57,04 (0,82) <sup>b</sup>	55,18 (0,84) <sup>ab</sup>	53,56 (0,86) <sup>a</sup>	*	NS	NS	**	NS
FDA	59,99 (1,67) <sup>b</sup>	55,69 (1,68) <sup>a</sup>	53,56 (1,68) <sup>a</sup>	***	NS	NS	***	NS

**Referencias:** MS, materia seca, MO, materia orgánica, PB, proteína bruta, FDA, fibra detergente ácido, FDN, fibra detergente neutro. <sup>abc</sup> Letras diferentes en igual fila indican diferencias significativas entre medias. \* P < 0,05; \*\* P < 0,01; \*\*\* P < 0,001. <sup>1</sup> BPB: baja proteína bruta; MPB: media proteína bruta, APB: alta proteína bruta. <sup>2</sup> Contrastes: Trat (tratamiento); P (periodo); S (secuencia); L (respuesta lineal); Q (respuesta cuadrática). <sup>3</sup> Oferta descontando el rechazo. <sup>4</sup> Excreción fecal estimada utilizando FDA indigestible como un marcador interno. <sup>5</sup> Digestibilidades aparentes estimadas a partir de muestras fecales puntuales, usando FDA indigestibles como un marcador interno.

**Tabla 4.5.** Consumo de materia seca, producción de leche y composición de la leche en vacas que consumieron dietas con bajo, medio o alto nivel de proteína bruta (valores medios (error estándar))

Ítem	Dietas <sup>1</sup>			Contrastes <sup>2</sup>				
	BPB	MPB	APB	Trat	P	S	L	Q
PV, kg	647,8 (10,3)	645,3 (10,3)	648,0 (10,3)	NS	NS	NS	NS	NS
CC	2,83 (0,08)	2,85 (0,08)	2,88 (0,08)	NS	NS	NS	NS	NS
CMS , kg/d	23,88 (0,12)	23,73 (0,12)	23,69 (0,13)	NS	NS	NS	NS	NS
Producción de leche, kg/d	30,14 (0,60) <sup>a</sup>	32,40 (0,60) <sup>b</sup>	34,92 (0,61) <sup>c</sup>	***	NS	NS	***	NS
PL/CMS, kg/kg	1,26 (0,02) <sup>a</sup>	1,37 (0,02) <sup>b</sup>	1,47 (0,02) <sup>c</sup>	***	NS	NS	***	NS
LCE <sup>3</sup>	30,72 (0,78) <sup>a</sup>	33,53 (0,79) <sup>b</sup>	36,41 (0,79) <sup>c</sup>	***	NS	NS	***	NS
LCG 3,5% <sup>4</sup>	31,48 (0,80) <sup>a</sup>	33,92 (0,81) <sup>b</sup>	36,58 (0,81) <sup>c</sup>	***	NS	NS	***	NS
LCGP <sup>5</sup>	28,59 (0,71) <sup>a</sup>	30,76 (0,71) <sup>b</sup>	33,44 (0,71) <sup>c</sup>	***	NS	NS	***	NS
<b>Grasa en leche(GB)</b>								
%	3,77 (0,11)	3,79 (0,11)	3,79 (0,11)	NS	NS	NS	NS	NS
kg / día	1,13 (0,04) <sup>a</sup>	1,23 (0,04) <sup>b</sup>	1,32 (0,04) <sup>c</sup>	***	NS	NS	***	NS
<b>Proteína en leche (PBL)</b>								
%	3,11 (0,03) <sup>a</sup>	3,18 (0,03) <sup>ab</sup>	3,23 (0,03) <sup>b</sup>	*	NS	NS	*	NS
kg / día	0,93 (0,02) <sup>a</sup>	1,03 (0,02) <sup>b</sup>	1,13 (0,02) <sup>c</sup>	***	NS	NS	***	NS
<b>Proteína verdadera en leche</b>								
%	2,95 (0,03) <sup>a</sup>	3,02 (0,03) <sup>ab</sup>	3,07 (0,03) <sup>b</sup>	*	NS	NS	*	NS
kg / día	0,89 (0,02) <sup>a</sup>	0,98 (0,02) <sup>b</sup>	1,07 (0,02) <sup>c</sup>	***	NS	NS	***	NS
<b>Lactosa</b>								
%	4,81 (0,06)	4,86 (0,06)	4,85 (0,07)	NS	NS	NS	NS	NS
kg / día	1,46 (0,05) <sup>a</sup>	1,57 (0,05) <sup>b</sup>	1,70 (0,05) <sup>c</sup>	***	NS	NS	***	NS
<b>SNG</b>								
%	8,72 (0,06)	8,72 (0,06)	8,83 (0,06)	NS	NS	NS	NS	NS
kg / día	2,64 (0,07) <sup>a</sup>	2,82 (0,07) <sup>b</sup>	3,07 (0,07) <sup>c</sup>	***	NS	NS	***	NS

**Referencias:** <sup>abc</sup> Letras diferentes en igual fila indican diferencias significativas entre medias. \* P < 0,05; \*\* P < 0,01; \*\*\* P < 0,001. <sup>1</sup> BPB: baja proteína bruta; MPB: media proteína bruta, APB: alta proteína bruta. <sup>2</sup> Contrastes: Trat (tratamiento); P (periodo); S (secuencia); L (respuesta lineal); Q (respuesta cuadrática). <sup>3</sup> LCE: calculado como salida de EN<sub>L</sub> de la leche (Mcal /día) /0,7 Mcal de EN<sub>L</sub> / kg de leche, donde la salida de EN<sub>L</sub> de leche = producción de leche, kg / d × (0,0929 × % de grasa de la leche + 0,0563 × % de proteína de la leche + 0,0395 × % de lactosa de la leche) (Tyrrell y Reid, 1965). <sup>4</sup> LCG 3,5%: leche corregida en grasa 3,5% = 0,4324 (kg de leche) + 16,216 (kg de grasa). <sup>5</sup>LCGP: leche corregida en grasa y proteína = producción de leche (kg / día) x [0,1226 × % de grasa + 0,0776 × proteína verdadera% + 0,2534] (Clark *et al.*, 2001).

**Tabla 4.6.** Consumo y partición del N y emisión de metano entérico en vacas que consumieron dietas con bajo, medio o alto nivel de proteína bruta (valores medios (error estándar)).

Ítem	Dietas <sup>1</sup>			Contrastes <sup>2</sup>				
	BPB	MPB	APB	Trat	P	S	L	Q
CMS	23,88 (0,12)	23,73 (0,12)	23,69 (0,13)	NS	NS	NS	NS	NS
Consumo de N, g N/día	497,5 ( 2,96) <sup>a</sup>	609,5 (2,99) <sup>b</sup>	723,2 ( 3,18) <sup>c</sup>	***	NS	NS	***	NS
Consumo de agua de bebida, kg / d	101,2 (1,95) <sup>a</sup>	104, 4 (2,00) <sup>a</sup>	113, 4 (2,06) <sup>b</sup>	**	NS	NS	**	NS
Balance de agua, kg / d	22,09(1,82)	22,36 (1,84)	23,35 (1,90)	NS	NS	NS	NS	NS
<b>Excreción</b>	1,26 (0,02) <sup>a</sup>	1,37 (0,02) <sup>b</sup>	1,47 (0,02) <sup>c</sup>	***	NS	NS	***	NS
Vol. de heces, kg MS/día	6,03 (0,07)	5,95 (0,08)	6,07 (0,08)	NS	NS	NS	NS	NS
MS Heces,%	16,65 (0,25) <sup>b</sup>	15,34 (0,25) <sup>a</sup>	14,81 (0,25) <sup>a</sup>	***	NS	NS	***	NS
Vol. de orina, kg/día	33,37 (0,46) <sup>a</sup>	35,89 (0,48) <sup>b</sup>	38,17 (0,48) <sup>c</sup>	***	NS	NS	***	NS
<b>N excretado g/día</b>								
Leche <sup>3</sup>	146, 4 (2,81) <sup>a</sup>	162, 2 (2,8 6) <sup>b</sup>	176,9 (2,88) <sup>c</sup>	***	NS	NS	***	NS
Heces <sup>4</sup>	131,2 (1,48) <sup>a</sup>	141,5 (1,53) <sup>b</sup>	157,5 (1,55) <sup>c</sup>	***	NS	NS	***	NS
Orina <sup>5</sup>	120,4 ( 2,82) <sup>a</sup>	209,2 ( 2,90) <sup>b</sup>	317,7 ( 2,94) <sup>c</sup>	***	NS	NS	***	**
Pérdidas N total (heces + orina)	251,4 (2,92) <sup>a</sup>	350,8 (3,01) <sup>b</sup>	475,4 (3,00) <sup>c</sup>	***	NS	NS	***	***
Balance de N <sup>6</sup>	100,4 (3,25) <sup>b</sup>	95,72 (3,37) <sup>b</sup>	71,28 (3,43) <sup>a</sup>	***	NS	NS	***	*
N en la orina, g/L	3,75 (0,10) <sup>a</sup>	5,94 (0,10) <sup>b</sup>	8,54 (0,10) <sup>c</sup>	***	NS	NS	***	NS

N ureico en orina N, g/L	1,60 (0,14) <sup>a</sup>	2,66 (0,15) <sup>b</sup>	4,59 (0,15) <sup>c</sup>	***	NS	NS	***	NS
N ureico: N total de orina,%	38,79 (2,88) <sup>a</sup>	45,41 (2,88) <sup>ab</sup>	52,30 (3,13) <sup>b</sup>	*	NS	NS	**	NS
<b>Excreción de N,% N consumido</b>								
Leche	29,45 (0,38) <sup>c</sup>	26,66 (0,38) <sup>b</sup>	24,48 (0,39) <sup>a</sup>	***	NS	NS	***	NS
Orina	24,18 (0,45) <sup>a</sup>	34,31 (0,46) <sup>b</sup>	43,98 (0,47) <sup>c</sup>	***	NS	NS	***	NS
Heces	26,45 (0,22) <sup>c</sup>	23,21 (0,23) <sup>b</sup>	21,85 (0,22) <sup>a</sup>	***	NS	NS	***	**
Pérdidas N total	50,62 (0,44) <sup>a</sup>	57,56 (0,45) <sup>b</sup>	65,87 (0,45) <sup>c</sup>	***	NS	NS	***	NS
Excreción N / urinario N g/kg	0,92 (0,03) <sup>a</sup>	1,48 (0,03) <sup>b</sup>	2,02 (0,03) <sup>c</sup>	***	NS	NS	***	NS
<b>Indicadores</b>								
EUN <sup>7</sup>	29,45 (0,38) <sup>c</sup>	26,66 (0,38) <sup>b</sup>	24,48 (0,39) <sup>a</sup>	***	NS	NS	***	NS
NUL, mg / dL <sup>8</sup>	9,83 (0,51) <sup>a</sup>	14,30 (0,52) <sup>b</sup>	18,07 (0,52) <sup>c</sup>	***	NS	NS	***	NS
NUS, mg / dL <sup>9</sup>	13,38 (0,61) <sup>a</sup>	24,25 (0,61) <sup>b</sup>	38,31 (0,61) <sup>c</sup>	***	NS	NS	***	NS
Glucosa, mg / dL	59,69 (0,69)	59,07 (0,70)	60,53 (0,71)	NS	NS	NS	NS	NS
<b>Emisión de metano</b>								
CH <sub>4</sub> , g/día	535,0 (45,83)	550,6 (54,18)	512,1 (51,83)	NS	NS	NS	NS	NS
CH <sub>4</sub> /CMS, g/kg	22,48 (2,02)	23,12 (2,39)	21,56 (2,29)	NS	NS	NS	NS	NS
CH <sub>4</sub> /PV, g/kg	0,84 (0,07)	0,88 (0,08)	0,78 (0,08)	NS	NS	NS	NS	NS
CH <sub>4</sub> /PL, g/kg	17,85 (1,77)	17,18 (1,86)	14,79 (1,57)	NS	NS	NS	NS	NS
Y <sub>m</sub>	6,85 (0,62)	7,06 (0,73)	6,60 (0,70)	NS	NS	NS	NS	NS

**Referencias:** <sup>abc</sup> Letras diferentes en igual fila indican diferencias significativas entre medias. \* P < 0,05; \*\* P < 0,01; \*\*\* P < 0,001. <sup>1</sup> BPB: baja proteína bruta; MPB: media proteína bruta, APB: alta proteína bruta. <sup>2</sup> Contrastes: Trat (tratamiento); P (periodo); S (secuencia); L (respuesta lineal); Q (respuesta cuadrática). <sup>3</sup> Calculado como Proteína de la leche (g / día) / 6,38. <sup>4</sup> La excreción fecal estimada utilizando FDA indigestible como un marcador interno. <sup>5</sup> La excreción urinaria se estimó utilizando la creatinina como marcador de volumen. <sup>6</sup> Balance N = N consumido – N fecal – N urinario + N leche y suponiendo que no hay deposición neta o movilización del tejido N. <sup>7</sup> EUN (%) = N secretado en la leche (g) / N consumido (g). <sup>8</sup> NUL: N ureico en leche. <sup>9</sup> NUS: N ureico en sangre.

**Tabla 4.7.** Variables económicas en vacas alimentadas con bajo, medio o alto nivel de proteína bruta (valores medios (error estándar)).

Ítem	Dietas <sup>1</sup>			Contrastes <sup>2</sup>				
	BPB	MPB	APB	Trat	P	S	L	Q
Ingresos, U\$\$/vaca/día	10,34 (0,21) <sup>a</sup>	11,11 (0,21) <sup>b</sup>	11,98 (0,21) <sup>c</sup>	***	NS	NS	***	NS
Costo de la ración, U\$\$/vaca/día	3,49 (0,02) <sup>a</sup>	3,72 (0,02) <sup>b</sup>	3,97 (0,02) <sup>c</sup>	***	NS	NS	***	NS
Costo de la ración, U\$\$/kg leche	0,12 (0,00)	0,11 (0,00)	0,11 (0,00)	NS	NS	NS	+	NS
Costo de la ración,% de los ingresos	33,92 (0,54)	33,40 (0,54)	33,27 (0,54)	NS	NS	NS	+	NS
Ingreso sobre alimentación (ISCA), U\$\$/día	6,84 (0,19) <sup>a</sup>	7,41 (0,19) <sup>b</sup>	8,00 (0,19) <sup>c</sup>	***	NS	NS	***	NS
Rendimiento de leche libre de ración, kg/vaca/día	19,96 (0,55) <sup>a</sup>	21,61 (0,55) <sup>b</sup>	23,34 (0,55) <sup>c</sup>	***	NS	NS	***	NS
Costo por emisiones de N <sub>2</sub> O, USD/vaca/día	0,09 (0,001) <sup>a</sup>	0,12 (0,001) <sup>b</sup>	0,16 (0,001) <sup>c</sup>	***	NS	NS	***	***
Costo por riesgo de lixiviación, USD/vaca/día	0,06 (0,001) <sup>a</sup>	0,08 (0,001) <sup>b</sup>	0,11 (0,001) <sup>c</sup>	***	NS	NS	***	***
Margen bruto con externalidades	6,69 (0,19) <sup>a</sup>	7,21 (0,19) <sup>b</sup>	7,73 (0,19) <sup>c</sup>	***	NS	NS	***	***
N <sub>2</sub> O, g/vaca/día	2,82 (0,05) <sup>a</sup>	3,72 (0,05) <sup>b</sup>	5,21 (0,05) <sup>c</sup>	***	NS	NS	***	***
N lix, g/vaca/día	61,37 (1,02) <sup>a</sup>	79,59 (1,06) <sup>b</sup>	109,43 (1,08) <sup>c</sup>	***	NS	NS	***	***

**Referencias:** <sup>abc</sup> Letras diferentes en igual fila indican diferencias significativas entre medias. \* P < 0,05; \*\* P < 0,01; \*\*\* P < 0,001. <sup>1</sup> BPB: baja proteína bruta; MPB: media proteína bruta, APB: alta proteína bruta. <sup>2</sup> Contrastes: Trat (tratamiento); P (periodo); S (secuencia); L (respuesta lineal); Q (respuesta cuadrática).

## 4.5. REFERENCIAS

- Acharya, I.P.; Schingoethe, D.J.; Kalscheur, K.F.; Casper, D.P. (2015). Response of lactating dairy cows to dietary protein from canola meal or distillers' grains on dry matter intake, milk production, milk composition, and amino acid status. *Canadian Journal of Animal Science*. **95**, 267–279.
- Aguerre, M.J.; Wattiaux, M.A. Powell; J.M. Broderick, G.A.; Arndt, C. (2011). Effect of forage-to-concentrate ratio in dairy cow diets on emission of methane, carbon dioxide, and ammonia, lactation performance, and manure excretion. *J. Dairy Sci.* **94**, 3081– 3093.
- AOAC, (1990). Official Methods of Analysis. 15th ed. Association of Official Analytical Chemists: Arlington, VA.
- AOAC, (1998). Official methods of analysis. 16th edn. Association of Official Analytical Chemists: Arlington, VA.
- AOAC, (1999). Official methods of analysis. 17th edn. Association of Official Analytical Chemists: Arlington, VA.
- Appuhamy, J.A.D.R.N.; Wagner-Riddle, C.; Casper, D.P.; France, J.; Kebreab, E. (2014). Quantifying body water kinetics and fecal and urinary water output from lactating Holstein dairy cows. *J. Dairy Sci.* **97**, 6177–6195.
- Arndt, C.; Powell, J.M.; Aguerre, M.J.; Wattiaux, M.A. (2015). Performance, digestion, nitrogen balance, and emission of manure ammonia, enteric methane, and carbon dioxide in lactating cows fed diets with varying alfalfa silage-to-corn silage ratios. *J. Dairy Sci.* **98**, 418–430.
- Bannink, A.; Smits, M.C.J.; Kebreab, E.; Mills, J.A.N.; Ellis, J.L.; Klop, A.; France, J.; Dijkstra, J. (2010). Simulating the effects of grassland management and grass ensiling on methane emission from lactating cows. *Journal of Agricultural Science* **148**, 55–72.
- Barros, T.; Quaassdorff, M.A.; Aguerre, M.A.; Colmenero, J.J.O.; Bertics, S.J.; Crump, P.M.; Wattiaux, M.A. (2017). Effects of dietary crude protein concentration on late-lactation dairy cow performance and indicators of nitrogen utilization. *J. Dairy Sci.* **100**, 1–15.
- Beauchemin, K.A.; Kreuzer, M.; O'Mara, F.; McAllister, T.A. (2009). Nutritional management for

enteric methane abatement: a review. *Aust. J. Ep. Agric.* **48**, 21–27.

Beukes, P.C.; Scarsbrook, M.R.; Gregorini, P.; Romera, A.J.; Clark, D.A.; Catto, W. (2012). The relationship between milk production and farm-gate nitrogen surplus for the Waikato region, New Zealand. *Journal of Environmental Management*. **93**, 44–51.

Broderick, G.A. (2003). Effects of varying dietary protein and energy levels on the production of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* **86**:1370–1381.

Broderick, G.A.; Clayton, M.K. (1997). A statistical evaluation of animal and nutritional factors influencing concentrations of milk urea nitrogen. *J. Dairy Sci.* **80**, 2964–2971.

Cabrita, A.R.J.; Dewhurst, R.J.; Melo, D.S. Mororby; J.M. Fonseca A.J.M. (2011). Effects of dietary protein concentration and balance of absorbable amino acids on productive responses of dairy cows fed corn silage-based diets. *J. Dairy Sci.* **94**, 4647–4656.

Cantalapiedra-Hijar, G.; Ortigues-Marty, I.; Sepchat, B.; Agabriel, J.; Huneau, J.; Fouillet, H. (2015). Diet–animal fractionation of nitrogen stable isotopes reflects the efficiency of nitrogen assimilation in ruminants. *British Journal of Nutrition*, **113** (7), 1158–1169.

Castillo, A.R.; Kebreab, E.; Beever, D.E.; France, J. (2000). A review of efficiency of nitrogen utilisation in lactating dairy cows and its relationship with environmental pollution. *Journal of Animal and Feed Science*, **9**, 1–32.

Castillo, A.R.; Kebreab, E.; Beever, D.E.; Barbi, J.H.; Sutton, J.D.; Kirby, H.C., France, J. (2001). The effect of protein supplementation on nitrogen utilization in lactating dairy cows fed grass silage diets. *J. Anim. Sci.* **79**, 247–253.

Chase, L. (2007). Feeding Low Crude Protein Rations to Dairy Cows – Opportunities and Challenges. <http://livestocktrail.illinois.edu/uploads/dairynet/papers/8%20Chase.pdf>

Chen, Y.; Harrisonb, J.H.; Buntingc, L.D. (2018). Effects of replacement of alfalfa silage with corn silage and supplementation of methionine analog and lysine-HCl on milk production and nitrogen feed efficiency in early lactating cows. *Animal Feed Science and Technology* **242**, 120–126.

Christensen, R.A.; Lynch, G.L.; Clark, J.H.; Yu, Y. (1993). Influence of amount and degradability of protein on production of milk and milk components by lactating Holstein cows. *J. Dairy*

*Sci.* **76**, 3490–3496.

- Clark, J.; Beede, D.K.; Erdman, R.A.; Goff, J.P.; Grummer, R.R.; Linn, J.G.; (2001) Nutrient requirements of dairy cattle, 7th rev edn. National Academy Press, Washington, D.C., p 321.
- Cochran, R.C.; Adams, D.C.; Wallace, J.D.; Galyean, M.L. (1986). Predicting digestibility of different diets with internal markers: Evaluation of four potential markers. *J. Anim. Sci.* **63**, 1476–1487.
- Colmenero, O.J.J.; Broderick, G.A. (2006). Broderick effect of dietary crude protein concentration on milk production and nitrogen utilization in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* **89**, 1704–1712.
- Corea, E.E.; Aguilera, J.M.; Alasa, N.P.; Alasa, E.A.; Flores, J.M.; Broderick, G.A. (2017). Effects of dietary cowpea (*Vigna sinensis*) hay and protein level on milk yield, milk composition, N efficiency and profitability of dairy cows. *Animal Feed Science and Technology* **226**, 48–55.
- Cressman, S. G.; Grieve, D.G.; Macleod, G.K.; Wheeler, E.E.; Young, L.G. (1980). Influence of dietary protein concentration on milk production by dairy cattle in early lactation. *J. Dairy Sci.* **63**, 1839–1847.
- Cunningham, K.D.; Cecava, M.J.; Johnson, T.R.; Ludden, P.A. (1996). Influence of Source and Amount of Dietary Protein on Milk Yield by Cows in Early Lactation. *J Dairy Sci.* **79**, 520–630.
- Dickhoefer, U.; Glowacki, S.; Gómez, C.A.; Castro-Montoya J.M. (2018). Forage and protein use efficiency in dairy cows grazing a mixed grass-legume pasture and supplemented with different levels of protein and starch. *Livestock Science.* **216**, 109–118.
- Dijkstra, J.; Oenema, O.; Bannink, A. (2011). Dietary strategies to reducing N excretion from cattle: implications for methane emissions. *Current Opinion in Environmental Sustainability*, **3**, 414–422.
- Dijkstra, J.; Oenema, O.; van Groenigen, J.W.; Spek, J.W.; van Vuuren, A.M.; Bannink, A. (2013). Diet effects on urine composition of cattle and N<sub>2</sub>O emissions. *Animal*, **7** (2), 292–302.
- Dini, Y.; Gere, J.; Briano, C.; Manetti, M.; Juliarena, P.; Picasso, V.; Gratton, R.; Astigarraga, L.

- (2012). Methane Emission and Milk Production of Dairy Cows Grazing Pastures Rich in Legumes or Rich in Grasses in Uruguay. *Animals*. **2**(2), 288-300.
- Edouard, N.; Hassouna, M.; Robin, P.; Faverdin, P. (2016). Low degradable protein supply to increase nitrogen efficiency in lactating dairy cows and reduce environmental impacts at barn level. *Animal*, **10** (2), 212–220.
- Frank, B.; Swensson, C. (2002). Relationship between content of crude protein in rations for dairy cows and milk yield, concentration of urea in milk and ammonia emissions. *J. Dairy Sci.* **85**, 1829–1838.
- Gere, J.I. (2012). La técnica de trazado por SF<sub>6</sub> para medir emisiones de CH<sub>4</sub> de rumiantes en pastoreo: desarrollos metodológicos y algunas aplicaciones. Tesis para optar al título de Doctor en Ciencias Físicas. Facultad de Ciencias Exactas, UNCPBA. Tandil, Buenos Aires.
- Gere, J.; Gratton, R. (2010). Simple, low-cost flow controllers for time averaged atmospheric sampling and other applications. *Latin American Applied Research*. **40**, 377-381.
- Grainger, C.; Beauchemin, K. (2011). Can enteric methane emissions from ruminants be lowered without lowering their production? **166-167**, 308-320.
- Gregorini, P.; Beukes, P.C.; Dalley, D.; Romera, A.J. (2016). Screening for diets that reduce urinary nitrogen excretion and methane emissions while maintaining or increasing production by dairy cows. *Sci Total Environ.* **551–552**, 32–41.
- Groff, E.B.; Wu, Z. (2005). Milk production and nitrogen excretion of dairy cows fed different amounts of protein and varying proportions of alfalfa and corn silage. *J. Dairy Sci.* **88** (10), 3619–3632.
- Hassanat, F.; Gervais, R.; Julien, C.; Massé, D.I.; Lettat, A.; Chouinard, P.Y.; Petit, H.V.; Benchaar, C. (2013). Replacing alfalfa silage with corn silage in dairy cow diets: Effects on enteric methane production, ruminal fermentation, digestion, N balance, and milk production. *J. Dairy Sci.* **96**, 4553–4567.
- Herrero, M.A., Gil, S.B., Sardi, G.M., Flores, M.C., Carbó, L.I., Orlando, A.A. (2006). Transferencia de nutrientes del área de pastoreo a la de ordeño en tambos semiextensivos en Buenos Aires, Argentina. *Revista InVet.* **8**, 23-30.

- Hindrichsen, I. K.; Wettstein, H.R.; Machmüller, A.; Jörg, B.; Kreuzer, M. (2005). Effect of the carbohydrate composition of feed concentrates on methane emission from dairy cows and their slurry. *Environ. Monit. Assess.* **107**, 329–350.
- Holter, J.B., Byrne, J.A.; Schwab, C.G. (1982). Crude protein for high milk production. *J. Dairy Sci.* **65**, 1175–1188.
- Holtshausen, L.; Chaves, A.V.; Beauchemin, K.A.; McGinn, S.M.; McAllister, T.; Odongo, N. (2009). Feeding saponin-containing *Yucca schidigera* and *Quillaja saponaria* to decrease enteric methane production in dairy cows. *J. Dairy Sci.* **92**, 2809–2821.
- Hristov, A.N.; Etter, R.P.; Ropp, J.K.; Grandeem, K.L. (2004). Effect of dietary crude protein level and degradability on ruminal fermentation and nitrogen utilization in lactating dairy cows. *J. Anim. Sci.* 2004. **82**, 3219–3229.
- Hristov, A.N.; Giallongo, F. (2014). Feeding protein to dairy cows—what should be our target?. Proc Tri-State Dairy Nutr Conference; Fort Wayne, IN. 75–84.
- Huhtanen, P.; Kaustell, K.; Jaakkola, S. (1994). The use of internal markers to predict total digestibility and duodenal flow of nutrients in cattle given 6 different diets. *Anim. Feed Sci. Technol.* **48**, 211–227.
- Huhtanen, P.; Shingfield, K.J. (2005). Grass silage: Factors affecting efficiency of N utilization in milk production. Pages 35–50 in *Silage Production and Utilisation*, Proc. XIVth Int. Silage Conf., Belfast, UK. R. S. Park and M. D. Stronge, ed. Wageningen Academic Publ., Wageningen, The Netherlands.
- Huhtanen, P.; Hristov, A.N. (2009). A meta-analysis of the effects of dietary protein concentration and degradability on milk protein yield and milk N efficiency in dairy cows. *J. Dairy Sci.* **92**, 3222–3232.
- Hutjens, M.; Chase, L.E. (2012). Interpreting milk urea nitrogen (MUN) values. Extension - America's research-based learning network. <https://articles.extension.org/pages/11322/interpreting-milk-urea-nitrogen-mun-values>.
- Hynes, D.N.; Stergiadis, S.; Gordon, A.; Yan, T. (2016). Effects of crude protein level in concentrate supplements on animal performance and nitrogen utilization of lactating dairy

- cows fed fresh-cut perennial grass. *J. Dairy Sci.* **99**, 1–10.
- IPCC. (2006). Guidelines for National Greenhouse Gas Inventories, Prepared by the National Greenhouse Gas Inventories Program. H. S. Eggleston, L. Buendia, K. Miwa, T. Ngara, and K. Tanabe, ed. IGES, Kanagawa, Japan. <http://www.ipcc-nggip.iges.or.jp/public/2006gl/index.htm>
- Ipharraguerre, I.R.; Clark, J.H. (2005). Impacts of the source and amount of crude protein on the intestinal supply of nitrogen fractions and performance of dairy cows. *J. Dairy Sci.* **88** (1), E22-37.
- Ipharraguerre, I.R.; Clark, J.H.; Freeman, D.E. (2005). Varying Protein and Starch in the Diet of Dairy Cows. I. Effects on Ruminal Fermentation and Intestinal Supply of Nutrients. *J. Dairy Sci.* **88**, 2537–2555.
- ISO 13906- 2008. Animal feeding stuffs – determination of acid detergent fibre and acid detergent lignin contents. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- Johnson, T.R.; Cecava, M.J.; Sheiss, E.B.; Cunningham K.D. (1994). Additions of ruminally degradable crude protein and branched-chain volatile fatty acids to diets containing hydrolyzed feather meal and blood meal for lactating cows. *J. Dairy Sci.* **77**, 3676-3682.
- Kauffman, A. J.; St-Pierre, N. (2001). The relationship of milk urea nitrogen excretion in Holstein and Jersey cows. *J. Dairy Sci.* **84**, 2284–2294.
- Kidane, A.; Øverland, M.; Mydland, L.T.; Prestløkken, E. (2018). Interaction between feed use efficiency and level of dietary crude protein on enteric methane emission and apparent nitrogen use efficiency with Norwegian Red dairy cows. *J Anim Sci.* **97**, 3967–3982.
- Kohn, R.A. (2007). Use of milk or blood urea nitrogen to identify feed management inefficiencies and estimate nitrogen excretion by dairy cattle and other animals. Florida Ruminant Nutrition Symposium, Gainesville, FL. 30–31 Jan. 2007.
- Lapierre, H.; Berthiaume, R.; Raggio, G.; Thivierge, M.C.; Doepel, L.; Pacheco, D.; Dubreuil, P.; Lobley, G.E. (2005). The route of absorbed nitrogen into milk protein. *J. Anim. Sci.* **80**, 11–22.
- Lee, C.; Hristov, A.N.; Heyler, K.S.; Cassidy, T.W.; Long, M.; Corl, B.A.; Karnati, S.K.R. (2011). Effects of dietary protein concentration and coconut oil supplementation on nitrogen

utilization and production in dairy cows. *J. Dairy Sci.* **94**, 5544–5557.

Lee, C.; Hristov, A.N.; Heyler, K.S.; Cassidy, T.W.C.; Lapierre, H.; Varga, G.A.; Arys, C.P. (2012). Effects of metabolizable protein supply and amino acid supplementation on nitrogen utilization, milk production, and ammonia emissions from manure in dairy cows. *J. Dairy Sci.* **9** (5), 5253–5268.

Leonardi, C.; Stevenson, M.; Armentano, L.E. (2003). Effect of two levels of crude protein and methionine supplementation on performance of dairy cows. *J. Dairy Sci.* **86**, 4033–4042.

Mutsvangwa, T.; Davies, K.L.; McKinnon, J.J.; Christensen, D.A. 2016. Effects of dietary crude protein and rumen-degradable protein concentrations on urea recycling, nitrogen balance, omasal nutrient flow, and milk production in dairy cows. *J. Dairy Sci.* **99**, 1–13.

Niu, M.; Appuhamy, J.A.D.R.N.A.; Leytem, A.B.; Dungan, R.S.; Kebreab, E. (2016). Effect of dietary crude protein and forage contents on enteric methane emissions and nitrogen excretion from dairy cows simultaneously. *Animal Production Science*, **56**, 312–321.

Noftsker, S.; St-Pierre, N.R. (2003). Supplementation of methionine and selection of highly digestible rumen undegradable protein to improve nitrogen efficiency for milk production. *J. Dairy Sci.* **86**, 958–969.

Nousiainen, J.; Shingfield, K.J.; Huhtanen, P. (2004). Evaluation of milk urea nitrogen as a diagnostic of protein feeding. *J. Dairy Sci.* **87**, 386–398.

NRC. (2001). Nutrient Requirements of Dairy Cattle. 7th rev. ed. Natl. Acad. Sci., Washington, D.C.

Odongo, N. E.; Or-Rashid, M.M.; Kebreab, E.; France, J.; McBride, B.W. (2007). Effect of supplementing myristic acid in dairy cow rations on ruminal methanogenesis and fatty acid profile in milk. *J. Dairy Sci.* **90**, 1851–1858.

Pfeffer, E.; Schuba, J.; Südekum, K.H. (2016). Nitrogen supply in cattle coupled with appropriate supply of utilisable crude protein at the duodenum, a precursor to metabolisable protein. *Archives of animal nutrition.* **70**(4), 293–306.

Podesta, S.C.; Hatew, B.; Klop, G.; Van Laar, H.; Kinley, R.D.; Bannink, A.; Dijkstra, J. (2013). The effect of nitrogen fertilization level and stage of maturity of grass herbage on methane

emission in lactating cows. Proceedings of the 5th Greenhouse Gas in Animal Agriculture Conference, Dublin, Ireland. *Advances in Animal Biosciences* **4**, 272.

Powell, J.M.; Rotz, C.A.; Wattiaux, M.A. (2014). Potential use of milk urea nitrogen to abate atmospheric nitrogen emissions from Wisconsin dairy farms. *J. Environ. Qual.* **43**, 1169–1175.

Rotz, C.A. (2018). Modeling greenhouse gas emissions from dairy farms. *J. Dairy Sci.* **101**, 6675–6690.

Sannes, R.A.; Messman, M.A.; Vagnoni D.B. (2002). Form of rumen-degradable carbohydrate and nitrogen on microbial protein synthesis and protein efficiency of dairy cows. *J. Dairy Sci.* **85**, 900–908.

SAS (2003). SAS studio Institute, SAS Inst. Inc., Cary, NC.

Sinclair, K.D., Garnsworthy, P.C., Mann, G.E. Sinclair, L.A. (2014). Reducir la proteína de la dieta en las dietas de vacas lecheras: implicaciones para la utilización del nitrógeno, la producción de leche, el bienestar y la fertilidad. *Animal*, **8** (2), 262-274.

Spek, J.; Bannink, A.; Gort, G.; Hendriks, W.; Dijkstra, J. (2013). Interaction between dietary content of protein and sodium chloride on milk urea concentration, urinary urea excretion, renal recycling of urea, and urea transfer to the gastrointestinal tract in dairy cows. *J. Dairy Sci.* **96**, 5734–5745.

Sutter, F.; Schwarmb, A.; Kreuzerb, M. (2017). Development of nitrogen and methane losses in the first eight weeks of lactation in Holstein cows subjected to deficiency of utilisable crude protein under restrictive feeding conditions *Archives of Animal Nutrition*, **71**, 1–20.

Tyrrell, H.F.; Reid, J.T. (1965). Prediction of the energy value of cow's milk. *J. Dairy Sci.* **48**, 1215–1223.

Valadares, R.F.D.; Broderick, G.A.; Valadares Filho, S.C.; Clayton, M.K. (1999). Effect of replacing alfalfa silage with high moisture corn on ruminal protein synthesis estimated from excretion of total purine derivatives. *J. Dairy Sci.* **82**, 2686–2696.

van der Stelt, B.; van Vliet, P.C.; Reijs, J.W.; Temminghoff, E.J.; van Riemsdijk W.H. (2008). Effects of dietary protein and energy levels on cow manure excretion and ammonia

- volatilization. *J. Dairy Sci.* **91**, 4811–4821.
- Van Soest, P.J.; Robertson, J.B.; Lewis, B.A. (1991). Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* **74**, 3583–3597.
- van Vuuren, A.M.; Smits, M.C.J. (1997). Effect of nitrogen and sodium chloride intake on production and composition of urine in dairy cows. *Gaseous Nitrogen Emissions from Grasslands*, CAB Int, Oxon. 95–99.
- Wattiaux, M.A.; Karg, K.L.. (2004). Protein level for alfalfa and corn silage based diets. II. Nitrogen balance and manure characteristics. *J. Dairy Sci.* **87**, 3492–3502.
- Wheadon, N.M.; McGee, M.; Edwards, G.R. Dewhurst; R.J. (2014). Plasma nitrogen isotopic fractionation and feed efficiency in growing beef heifers. *British Journal of Nutrition.* **111**, 1705–1711.
- Wright, T. C.; Moscardini, S.; Luimes, P.H.; Susmel, P.; McBride, B.W. (1998). Effects of rumen-undegradable protein and feed intake on nitrogen balance and milk protein production in dairy cows. *J. Dairy Sci.* **81**, 784–793.
- Wu, Z.; Satter, L.D. (2000). Milk production during the complete lactation of dairy cows fed diets containing different amounts of protein. *J Dairy Sci.* **83**, 1042–1051.

## CAPÍTULO 5 – EFECTO DEL NIVEL DE PROTEÍNA EN LA DIETA SOBRE LA FERMENTACIÓN RUMINAL EN UN SISTEMA DE DOBLE FLUJO CONTINUO

### 5.1. INTRODUCCIÓN

En lechería, el manejo de la nutrición es una herramienta clave para reducir la contaminación ambiental, y junto a ello una mejor comprensión del comportamiento ruminal. Como ya se planteó en el capítulo 2, el contenido de PB en la dieta es uno de los factores más importantes en determinar la tasa de reciclaje de urea hacia el tracto digestivo y su utilización por los microorganismos en el rumen (Reynolds y Kristensen, 2008), y esto permitiría mantener los niveles de producción, minimizando el consumo de PB y la eliminación de N vía heces y orina (Lee *et al.*, 2011). Otro aspecto importante en relación al impacto ambiental es la emisión de metano entérico. La investigación sobre los metanógenos en el rumen ha atraído gran interés en la última década, debido al impacto del CH<sub>4</sub> emitido por la ganadería. La mayor parte del CH<sub>4</sub> entérico producido por los rumiantes tiene su origen en el rumen (Murray *et al.*, 1976; Martin *et al.*, 2010). La digestión ruminal de los alimentos por los microorganismos da lugar a la producción de AGV, utilizados por el animal como fuente de energía, y la producción de CO<sub>2</sub> y CH<sub>4</sub> eliminados por el proceso de eructación (Martin *et al.*, 2010). En la actualidad, el desafío es reducir las emisiones de CH<sub>4</sub> entérico de los rumiantes sin alterar la producción animal (Martin *et al.*, 2010; Histrov *et al.*, 2013; Knapp *et al.*, 2014). En este contexto, es de interés conocer el efecto que distintos niveles de PB en la dieta pueden tener sobre la producción de CH<sub>4</sub> entérico. Este efecto no es claro y merece ser estudiado (Cárdenas *et al.*, 2007; Dijkstra *et al.*, 2011).

Los sistemas de fermentación de doble flujo continuo se han utilizado con éxito para la evaluación rápida de la respuesta ruminal a diferentes escenarios de alimentación hipotéticos (de Veth y Kolver, 2001; Bargo *et al.*, 2003; Wales *et al.*, 2004). Debido a la complejidad de la metodología para evaluar las emisiones de CH<sub>4</sub> entérico a campo, la posibilidad de obtener resultados a través de métodos *in vitro* es una alternativa interesante.

El objetivo de este trabajo fue evaluar los efectos de distintos niveles de PB en la dieta, utilizadas en ganado lechero, sobre la fermentación ruminal, la producción de CH<sub>4</sub>, el metabolismo del N, la eficiencia de síntesis de masa microbiana y la población microbiana, en un sistema *in vitro* de doble flujo continuo.

## 5.2. MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se realizó en el Laboratorio de Fermentadores del Departamento de Producción Animal de la Unidad Integrada Balcarce (Estación Experimental Agropecuaria Balcarce, INTA–Facultad de Ciencias Agrarias, UNMDP), Balcarce, provincia de Buenos Aires, desde el 21 de febrero al 26 de marzo de 2018.

El uso de animales en este estudio fue realizado bajo la aprobación del comité de Bienestar Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad del Centro de la Provincia de Buenos Aires (Acta de Bienestar Animal ResCa 087/02).

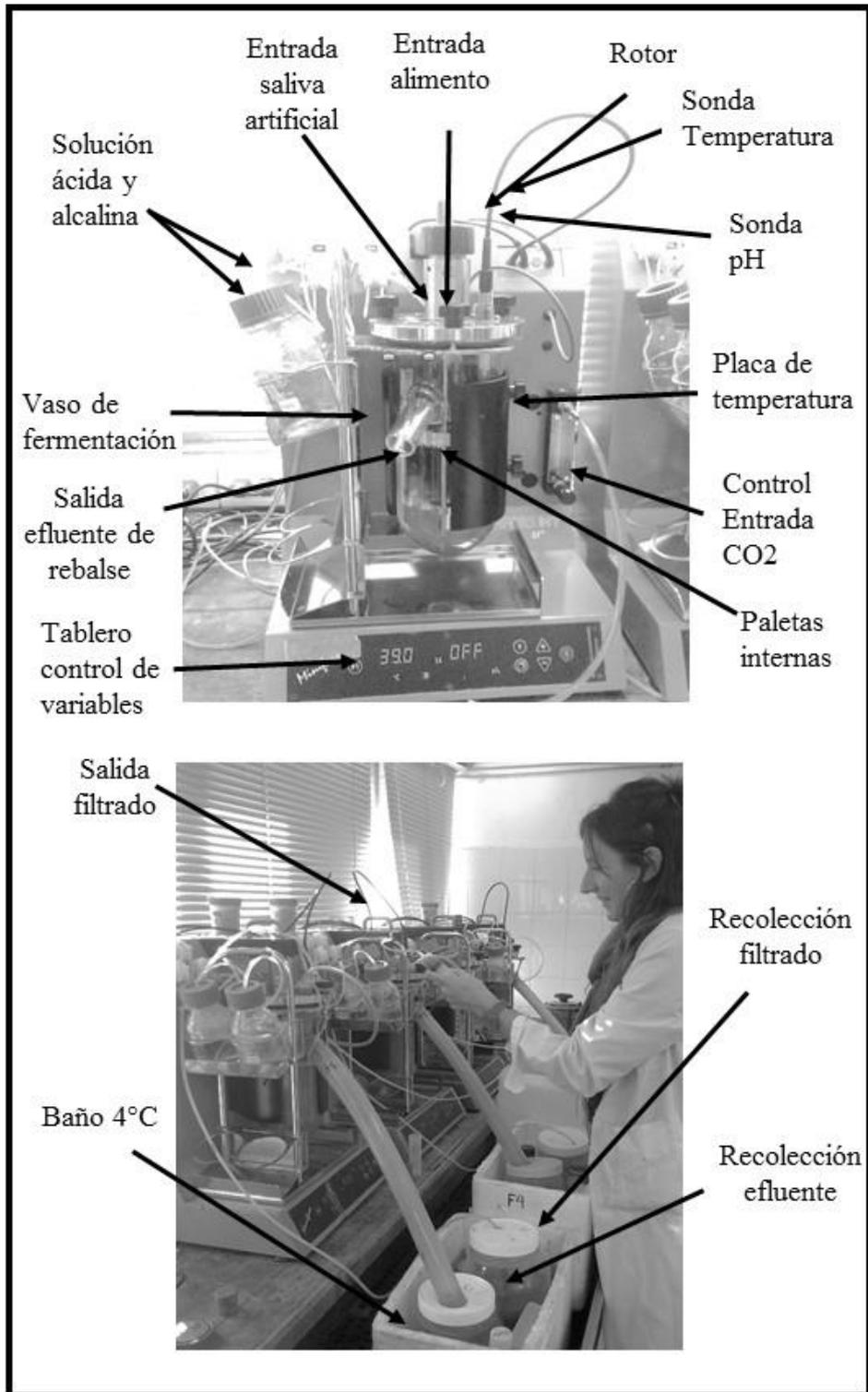
### 5.2.1. Diseño experimental y dietas.

---

Se utilizaron tres fermentadores (Miniford, Infords, Bottminger, Switzerland; Figura 5.1) adaptados para que funcionen como un sistema de doble flujo continuo. Los mismos se encuentran diseñados para simular la digestión ruminal y el flujo de sólidos y líquidos que salen del rumen hacia el intestino delgado (Figura 5.1).

Se compararon las tres dietas a base de heno de alfalfa, silaje de maíz y concentrado (a base de grano de maíz y harina de soja) con diferente contenido de PB utilizadas en el ensayo *in vivo* presentado en el capítulo 4. El diseño utilizado fue un cuadrado latino de  $3 \times 3$  (3 dietas, 3 fermentadores y tres períodos experimentales). Las distintas dietas se prepararon con los mismos alimentos a las utilizadas en el experimento realizado con las vacas lecheras (Capítulo 4). Los contenidos de PB utilizados en este estudio fueron 13,0 %, 16,1 % y 19,2 % (Tablas 5.1 y 5.2).

Previo a la preparación de las dietas, los distintos componentes de las mismas, muestreados durante el ensayo a campo del capítulo 4 – heno de alfalfa, silaje de maíz, harina de soja, grano de maíz y las sales – fueron secados en estufa con circulación de aire forzado (60 ° C durante 48 horas). Los alimentos fueron molidos con tamiz de 2 mm y las raciones se elaboraron en base seca. Cada período experimental consistió de 7 días hasta alcanzar las condiciones de equilibrio del sistema y 3 días (72 horas) de mediciones.



**Figura 5.1:** Componentes de los fermentadores de doble flujo continuo utilizados en el experimento.

**Tabla 5.1:** Composición química de los ingredientes utilizados en las dietas experimentales. Los valores de degradabilidad de la fracción de proteína bruta fueron evaluados mediante Daisy II.

Ítem	Silaje de Maíz	Heno de alfalfa	Harina de soja	Grano de maíz (molido)
MS, %	27,1	87,3	91,8	88,0
PB, % de MS	9,4	20,1	47,3	9,3
FDN, % de MS	39,6	47,9	9,6	12,5
FDA, % de MS	24,2	33,2	4,9	3,6
NIDA, % de N	7,0	6,9	1,4	7,327
LDA, % de MS	2,2	8,6	1,0	0,6
EE, % de MS	2,9	1,6	1,9	3,1
Cenizas, % de MS	5,6	10,0	7,6	2,5
CNF <sup>1</sup> , %	42,5	20,5	33,7	72,6
EM, <sup>2</sup>	2,3	1,8	3,3	3,0
EN <sub>L</sub> , <sup>2</sup> Mcal/kg	1,5	1,1	2,1	1,9
Degradabilidad ruminal de la PB <sup>3</sup>				
a, %	47,3	39,2	25,8	18,5
b, %	28,5	43,8	67,6	74,5
c, %/hora	6,3	11,3	8,4	4,1

MS, materia seca, PB, proteína bruta, NIDA, nitrógeno insoluble en detergente ácido, FDA, fibra detergente ácido, FDN, fibra detergente neutro, LDA, lignina detergente ácido, EE, extracto etéreo, CNF, carbohidratos no fibrosos, NDT, nutrientes digestibles totales, ED, energía digestible, EM, energía metabolizable, EN<sub>L</sub>, energía neta para lactación, EB, energía bruta. La mezcla de minerales y vitaminas contenía (por kg de MS): 16.0% Ca, 8.0% P, 4.5% Mg, 1.8% K, 1.0% S, 6.3% Na, 10% de Cl, 2.100 mg Fe. <sup>1</sup> CNF = 100 – (PB % + FDN % + EE % + cenizas %). <sup>2</sup> Estimada usando el modelo NRC (2001). <sup>3</sup> Evaluación en Daisy II (0, 1, 2, 4, 8, 12, 16, 24, 32 y 48 hs).

**Tabla 5.2:** Ingredientes y composición química de las dietas experimentales utilizadas en los fermentadores de doble flujo continuo.

Ítem	Dietas <sup>1</sup>		
	BPB	RPB	APB
<b>Porcentaje en la dieta, % de MS dieta</b>			
Silaje de maíz, %	30,80	30,80	30,80
Heno de alfalfa, %	26,60	26,60	26,60
Grano de maíz (molido), %	38,43	30,30	22,20
Harina de soja, %	2,58	10,70	18,80
Sales mix Mineral-vitaminico <sup>1</sup>	1,29	1,29	1,29
Bicarbonato de sodio	0,30	0,30	0,30

### Composición química de las dietas a partir del análisis químico de los componentes

MS, %	52,0	52,1	52,2
PB, % de MS	13,0	16,1	19,2
N, % de MS	2,1	2,6	3,1
FDN, % de MS	30,0	29,8	29,5
FDA, % de MS	17,8	17,9	18,0
NIDA, % de N	6,8	6,3	5,9
LDA, % de MS	3,2	3,2	3,3
EE, % de MS	2,6	2,5	2,4
Cenizas, % de MS	5,5	5,9	6,3
MO, % de MS	94,5	94,1	93,7
CNF, <sup>2</sup> % de MS	47,3	44,2	41,0
EM, <sup>3</sup> Mcal/kg	2,4	2,5	2,5
EN <sub>L</sub> , <sup>3</sup> Mcal/kg	1,54	1,6	1,6
PDR, %	8,0	10,0	12,0
PNDR, %	5,0	6,0	7,0
PDR, <sup>3</sup> % de la PB	61,5	62,6	63,3
PNDR, <sup>3</sup> % de la PB	38,5	37,4	36,7

MS, materia seca, PB, proteína bruta, NIDA, nitrógeno unido a la fibra en detergente neutro, FDA, fibra detergente ácido, FDN, fibra detergente neutra, LDA, lignina detergente ácido, EE, extracto etéreo, CNF, carbohidratos no fibrosos, NDT, nutrientes digestibles totales, ED, energía digestible, EM, energía metabolizable, EN<sub>L</sub>, energía neta para lactación, EB, energía bruta. La mezcla de minerales y vitaminas contenía (por kg de MS): 16.0% Ca, 8.0% P, 4.5% Mg, 1.8% K, 1.0% S, 6.3% Na, 10% de Cl, 2.100 mg Fe. <sup>1</sup> BPB: baja proteína bruta; MPB: media proteína bruta, APB: alta proteína bruta. <sup>2</sup> CNF = 100 - (PB % + FDN % + EE % + cenizas %). <sup>3</sup> Estimado usando el modelo NRC (2001) con datos obtenidos por Daisy II.

#### 5.2.2. Condiciones de los fermentadores.

Se utilizaron 3 fermentadores de 1550 ml ± 32 ml de doble flujo continuo. Como donante de fluido ruminal se utilizó un novillo Hereford canulado (PV 480 ± 14,1 kg) alimentado, desde 21 días antes al momento de colecta, con una dieta 58% de forraje (rollo pastura de buena calidad; 17,5% PB) y 42% de concentrado (16% PB), al 2,5% PV dos veces al día.

El fluido ruminal se colectó manualmente desde las áreas ventral, central y dorsal del rumen a las 7:30 hs, aproximadamente 3 h después de la alimentación matinal. En cada período se recogieron aproximadamente 8 litros de contenido ruminal. Dentro de los 15 minutos de la recolección, el contenido ruminal se filtró a través de 4 capas de tela de quesería y se mantuvo a

39° C dentro de un termo de 10 litros calefaccionado previamente a dicha temperatura. Luego se homogeneizó y se vertió en cada fermentador la cantidad necesaria hasta rebalsar la salida del efluente. El contenido de los fermentadores se agitó continuamente a una velocidad de 155 rpm, y la temperatura se mantuvo a 39°C a lo largo de cada periodo. Una vez que los fermentadores se completaron con el líquido ruminal, se comenzó a agregar la dieta indicada para cada fermentador según el tratamiento correspondiente.

Los fermentadores se alimentaron con un total de 90 g MS / d dividido en dos porciones iguales a las 08:00 y 20:00 hs, a través del orificio correspondiente para el alimento (Figura 5.1). Para evitar pérdidas de ración a través de la salida de efluente de rebalse al momento de la alimentación, los fermentadores contaban con paletas de acero sobre el interior del vaso de vidrio. El tiempo medio de retención fue de 20 h, la tasa de pasaje de los sólidos fue 5 %/hora y la tasa de dilución de la fase líquida de 10 %/hora, regulado mediante la infusión de saliva artificial (Tabla 5.3) y la eliminación del filtrado (Bargo *et al.*, 2003). La infusión de saliva artificial (2,5 ml/min) fue continua dentro de los fermentadores (Weller y Pilgrim, 1974) y la misma contenía 0,4 g/L de urea simulando el reciclado de N.

**Tabla 5.3:** Composición mineral de la saliva artificial utilizada en los fermentadores de doble flujo continuo.

<b>Componente</b>	<b>Cantidad</b>
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,76 g
NaHCO <sub>3</sub>	5,00 g
KCl	0,60 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,12 g
KHCO <sub>3</sub>	1,60 g
NH <sub>2</sub> CONH <sub>2</sub>	0,40 g
Agua destilada	1,00 L

Para mantener las condiciones anaeróbicas en los fermentadores se infundió CO<sub>2</sub> a flujo de 20 ml/min a lo largo del ensayo. El pH de los fermentadores se dejó fluctuar libremente dentro del rango 5 a 6,8. El control se realizó con el programa IRIS NT (Infords A.G., Bottemingen, Switzerland), mediante el cual, al pasar cualquiera de los límites, se infundía automáticamente una solución ácida (HCl 3N) o base (NaOH 5N) para mantener el rango establecido.

### 5.2.3. Mediciones, muestreo y análisis.

El pH fue registrado a lo largo cada período en forma continua cada 10 minutos a través de un sensor de pH digital (HA405-DPA, Mettler Toledo, Schwezenbach, Switzerland) fijo que posee cada fermentador (Figura 5.3). Los datos se almacenaron utilizando el programa IRIS NT (Infords A.G., Bottemingen, Switzerland). Para el análisis estadístico se consideraron los valores del pH cada diez minutos durante los tres días de mediciones.

MESES	Febrero		Marzo		Marzo			Marzo				
FECHAS	21	28	1	3	5	12	13	15	16	23	24	26
PERIODO	I				II				III			
	ADAPTACIÓN		MEDICIÓN		ADAPTACIÓN		MEDICIÓN		ADAPTACIÓN		MEDICIÓN	
pH												
Muestréos de efluentes												
Muestreo de filtrado (AGV)												
Muestreo de filtrado (N-NH <sub>3</sub> )												
Colección de gas CH <sub>4</sub>												
Muestreo contenido ruminal												
Muestreo ADN y PCR												

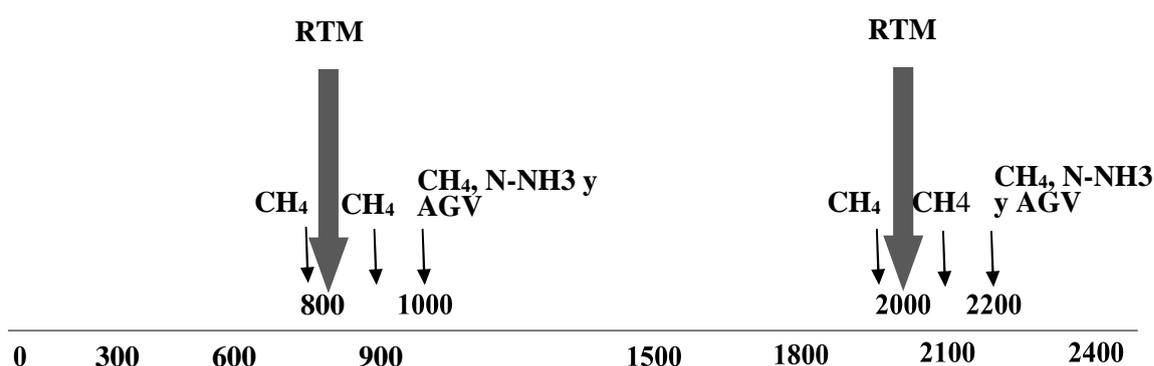
**Figura 5. 2:** Calendario resumen de etapas y muestreo de ensayo con fermentadores

Los efluentes (rebalse y filtrado) se recolectaron en recipientes de plástico de 4 L. Durante los primeros 7 días, el peso de los efluentes se registró diariamente a las 07:50 hs de cada día, se pesaron los recipientes y se descartaron los contenidos. Durante las últimas 72 horas de cada período, un baño de agua mantuvo los recipientes de recolección de efluente (sumergidas aproximadamente un tercio en el baño de agua) a 4°C, y se agregaron 20 mL de ácido sulfúrico al 50% a cada recipiente de forma diaria (después de vaciarlo) para inhibir la fermentación microbiana.

En los días 8 a 10, las muestras de efluentes sólidos y líquidos se recogieron a las 07:50 hs, se mezclaron y homogeneizaron con un mezclador durante 30 segundos a la velocidad más baja

posible, y se tomó y almacenó una submuestra de 600 ml a 4°C. Una muestra adicional de efluente de 50 ml fue filtrada a través de 8 capas de tela de quesería, y una alícuota de 15 ml de líquido fue preservada para determinar N-NH<sub>3</sub> (4 ml de licor ruminal + 4 ml de HCl 0,2 M), y AGV (9,9 ml de licor ruminal + 0,1 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Todas las muestras se almacenaron a -18° C hasta su análisis. El contenido de MS de los efluentes se determinó sobre una muestra compuesta de alícuotas de 100 ml de efluente de cada día de muestreo. Las submuestras de 600 ml de efluente fueron combinadas por fermentador (dentro del período), liofilizadas y luego molidas para pasar un tamiz Wiley de 1 mm y se guardaron hasta posterior análisis.

El día 9 de cada período en los horarios 0, 2, 4, 7 y 10 hs luego de la alimentación de la mañana, se extrajeron 60 ml del líquido del efluente de filtrado de cada fermentador, para determinar AGV y N-NH<sub>3</sub>, según la metodología descrita anteriormente. Además, durante los días 8, 9 y 10 de cada período, se recogieron muestras de gases para el análisis de CH<sub>4</sub> seis veces al día (previo a cada comida, a la hora y dos horas; Figura 5.3) usando una aguja de calibre 25 unida a una jeringa de 30 ml (Vibart *et al.*, 2007). Para evitar posible contaminación, se utilizaron una aguja y una jeringa para cada fermentador. Después de que la jeringa se vació 3 veces para purgar cualquier gas residual, la aguja se insertó a través de un tapón de caucho adaptado para el muestreo, ubicado en un puerto en la parte superior del fermentador, y se tomó una muestra de 30 ml de gas del espacio libre, la cual luego se transfirió a un vial de vidrio de 15 ml en vacío a través de una septa en su tapa, hasta su análisis.



**Figura 5.3:** Alimentación y horario de muestreo: alimentación (08:00 y 20:00 hs); muestreo de fase gaseosa para análisis de metano (7:55, 9:00, 10:00, 19:55, 21:00 y 22:00 hs); muestreo de filtrado para análisis de N amoniacal y AGV (10:00 y 21:00 hs). Adaptado de Vibart *et al.* (2007).

El día 10, además del muestreo de efluentes, se tomaron 500 ml de muestra del contenido ruminal de cada fermentador. Dicha muestra se homogeneizó con un mezclador durante 30 segundos como se describió anteriormente y se filtró a través de 2 capas de tela de queso en un recipiente de plástico de 500 ml con 5 ml de ácido sulfúrico al 50 % para retardar el crecimiento microbiano. Luego, se tomaron dos submuestras de 250 ml, una para el análisis de purinas y la otra para el recuento de bacterias totales y metanogénicas. Para el caso de purinas, cada submuestra fue procesada de acuerdo con el método de Griswold *et al.* (1996). Dichas submuestras se centrifugaron 3 veces a 20.000 g durante 20 minutos a 4 ° C en recipientes de 50 ml y el sedimento fue resuspendido en solución salina al 0,9% y metanol al 50% para las 2 últimas centrifugaciones (Griswold *et al.*, 1996). Una alícuota del pellet final se colocó en un recipiente de plástico estéril de 75 ml y se almacenó a -18°C hasta su posterior liofilización y análisis. Para el recuento de bacterias, la submuestra de 250 ml restante se centrifugó a 1000 g a 4 ° C durante 10 minutos y se congeló a -18° C para su posterior liofilización y análisis.

Todas las muestras de alimentos, efluentes y pellet microbiano se analizaron en el Laboratorio de Alimentos de la Estación Experimental de Rafaela (Santa Fe, Argentina) para determinar el N total (AOAC, 1998, método 976.05), MS analítica a 100 ° C durante 24 h, cenizas (AOAC, 1990, método 130.15 y 167.03), extracto etéreo (EE; AOAC, 1999, método 920.39), lignina (LDA; ANKOM, 2005), FDN y FDA secuencialmente utilizando según Van Soest *et al.* (1991) y adaptado para Ankom 200 Fiber Analyzer (Ankom Technology, Fairport, NY) basado en ISO 13906: 2008.

Los CNF se calcularon de acuerdo con NRC (2001) usando los valores de PB, FDN, EE y cenizas. La composición química de las dietas se calculó a partir de las mediciones de laboratorio y la proporción de ingredientes en la dieta. Además, se utilizó NRC (2001) para predecir características de la dieta seleccionadas (PNDR, PDR y EN<sub>L</sub>). Para el análisis de purinas de los pellets y de los efluentes, se utilizó el procedimiento de Zinn y Owens (1986) modificado por Makkar y Becker (1999).

Las determinaciones de N-NH<sub>3</sub> se realizaron por colorimetría según Chaney y Marbach (1962), y las muestras de AGV se enviaron congeladas al laboratorio LASERNU (UBA, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina). Para la determinación de los AGV, las muestras se purificaron previamente con ácido ortofosfórico (25%) en ácido sulfúrico 0,5 M a una tasa de 0,5 ml por 2 ml de muestra y luego se centrifugaron durante 10 minutos a 5000 g (Friggens *et al.*, 1998). A continuación, las muestras se inyectaron mediante un automuestreador Robokrom® GC

en un Konik 5000B GC equipado con un detector de ionización de llama. Los AGV se separaron en una columna capilar Nukol ( $30\text{ m} \times 0,32\text{ mm}$  de diámetro interno  $\times 0,25\text{ }\mu\text{m}$  de espesor, Perkin Elmer-Elite FFAP, Parte N9316354). Las temperaturas del inyector y del detector se mantuvieron en  $250^{\circ}\text{C}$  y las de la columna en  $156^{\circ}\text{C}$ . Se utilizó hidrógeno ( $\text{H}_2$ ) como gas portador y el flujo de la columna se mantuvo a una velocidad de  $2,4\text{ ml/min}$ . Para las curvas de calibración se utilizó la mezcla de ácidos volátiles Supelco (Cat. No. 46975-U).

Las muestras de gases se analizaron para  $\text{CH}_4$  utilizando un cromatógrafo de gases Perkin Elmer Clarus<sup>®</sup> 580 en el laboratorio de gases de INTA Castelar. Para el cálculo de la producción diaria media de  $\text{CH}_4$  (Soder *et al.*, 2016; véase el cálculo en la sección Análisis estadístico y Cálculos) se utilizó el promedio diario de los 6 muestreos temporales de  $\text{CH}_4$  (promediados dentro del tratamiento y en los 3 días de muestreo). Para graficar la salida de  $\text{CH}_4$ , se utilizó el promedio no acumulativo de la producción de  $\text{CH}_4$  en cada uno de los 6 tiempos de muestreo individuales (promediados dentro del tratamiento y en los 3 días de muestreo).

#### **5.2.4. Extracción de ADN y PCR.**

---

La extracción de ADN genómico total fue realizada a partir de  $0,25\text{g}$  de pellet ruminal (obtenido después de la centrifugación del líquido ruminal de cada fermentador) de acuerdo al método RBB+C (Yu y Morrison, 2004) combinando la ruptura de las células con perlas con las etapas de filtración en columna del kit QIAamp DNA Stool Mini (Qiagen, Alemania). Asimismo, el ADN fue analizado cualitativamente y cuantitativamente mediante corridas electroforéticas en geles de agarosa al  $0,8\%$  y mediante espectrofotometría a  $260\text{ nm}$  (Nanodrop ND-1000, Thermo Fisher Scientific, USA).

Las muestras de ADN se almacenaron a  $-20\text{ C}$  hasta su análisis. La cuantificación absoluta fue realizada mediante el uso del equipo ABI 7500 qPCR con el respaldo del software ABI 7500 v2.3 (Applied Biosystem-ABI<sup>®</sup>, USA). La reacción fue conducida en un volumen final de  $20\mu\text{L}$  compuesto por:  $4\text{ }\mu\text{L}$  5X HOT FIREPol EvaGreen qPCR Mix Plus (Solis BioDyne, Estonia),  $0,2\text{ }\mu\text{L}$  de cada primers ( $50\text{ pmol}$ ),  $2\text{ }\mu\text{L}$  de ADN genómico y  $13,8\text{ }\mu\text{L}$  de agua grado PCR. Los primers utilizados para la amplificación de la región 16S ARNr y *mcrA* fueron obtenidos de la bibliografía (Tabla 5.4) para bacterias totales y los metanógenos totales.

**Tabla 5.4:** PCR primers utilizados en el estudio.

Objetivo	Secuencia del primer (5' – 3')	Annealing (°C)	Tamaño Amplicon (pb)	Referencia
Methanogens ( <i>mcrA</i> )	F-TTC GGT GGA TCD CAR AGR GC R-GBA RGT CGW AWC CGT AGA ATC C	60	140	Denman et al. (2007)
Total bacterias ( <i>16S rRNA</i> )	F-CGG CAA CGA GCG CGA ACC C R-CCA TTG TAG CAC GTG TGT AGC C	60	130	Denman y McSweeney, (2006)

La amplificación involucró un ciclo de 95°C por 15 minutos para la activación de la enzima, seguida de 40 ciclos de 95° C por 30 segundos de desnaturalización, 60° C de hibridación por 30 segundos, y 72°C por 1 minuto de extensión (Singh *et al.*, 2014). Por otra parte, la especificidad del amplicón fue verificada de acuerdo con la curva de disociación del producto final de la PCR, mediante el incremento de la temperatura y la velocidad 1° C cada 30 segundos desde los 60 a 95° C. El número de copias de cada estándar fue estimado según Singh *et al.* (2014) con la siguiente ecuación:  $N^{\circ} \text{ copias}/\mu\text{L} = (\text{concentración del plásmido (g}/\mu\text{L}) \times 6,022 \times 10^{23}) / (\text{largo del plásmido recombinante (pb)} \times 660)$ . Por otra parte, se prepararon diluciones de 108 a 101 para construir la curva estándar para cada especie, y se amplificaron junto con las muestras por duplicado.

El número de copias de los genes 16S ARNr de cada muestra fue estimado a partir de la siguiente ecuación:  $N^{\circ} \text{ copias/g de rumen} = (Q \times C) / V$ , donde Q: es la media cuantitativa del número de copias, C: concentración total de ADN en cada muestra (ng/g) y V: es la concentración de ADN utilizado en la reacción (ng). En cada reacción, los valores de la regresión lineal de la curva estándar estuvieron dentro de los límites normales ( $r^2 = 0,98$ ; la pendiente = -3,2 a -3,6; eficiencia = 100-110%).

### 5.2.5. Análisis estadístico y cálculos

El análisis estadístico se realizó utilizando los procedimientos PROC MIXED en el software SAS (SAS studio Institute, 2003, SAS Inst. Inc., Cary, NC), de acuerdo con el siguiente modelo:

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

Donde:

$Y_{ijk}$ = variable dependiente medida en el fermentador  $j$  que se sometió al tratamiento  $i$  en el período  $k$ ;

$\mu$  = media general,

$T_i$  = efecto fijo del tratamiento  $i$ ,

$f_j$  = efecto aleatorio del fermentador  $j$ ,

$P_k$  = efecto aleatorio del período  $k$ ,

y  $e_{ijk}$  = error aleatorio asociado a la  $ijk$  observación.

En este análisis, el efecto fijo estuvo representado por los niveles de proteína y los efectos aleatorios estuvieron representados por los efectos del fermentador y del periodo. Los efectos fijos para evaluar el pH, N-NH<sub>3</sub> y AGV de los fermentadores fueron los niveles de proteína (P), el horario de recolección (T) y la interacción entre estos dos factores (P \* T). Se utilizó un esquema de mediciones repetidas en el tiempo, con tiempos de recolección (0, 1, 2, 4, 6, 8 y 10 h después de la alimentación) repetidos una vez dentro de cada unidad experimental (período de fermentación). Los resultados se presentan como medias con error estándar de diferencia y se realizaron contrastes lineales y cuadráticos de grado único de libertad. Las diferencias significativas se declararon a  $P \leq 0,05$ . Cuando el efecto principal del tratamiento fue significativo, las medias se separaron mediante una prueba t por pares (opción diff de PROC MIXED).

Para determinar las tasas de dilución se emplearon las siguientes fórmulas:

**TDL %** = [(Volumen del flujo filtrado (ml/hora) + Volumen del flujo de rebalse (ml/hora)) / Volumen del fermentador (ml)] x 100; Tasa de dilución de líquidos (TDL) = 10 %/hora = 0,10/hora

**TDS %** = [(Volumen del flujo de rebalse (ml/hora)) / Volumen del fermentador (ml)] x 100; Tasa de dilución de sólidos (TDS) = 5 %/hora = 0,05 /hora

Las digestibilidades aparentes (MS, MO, FDN y FDA) y verdaderas (MS, MO, PB) de los nutrientes se calcularon según lo descrito por Soder *et al.* (2013) y Del Bianco Benedetti *et al.* (2015) de la siguiente manera (MS como ejemplo):

**Digestibilidad aparente de la MS (% del total de MS)** = [(g de MS consumida - g de flujo de MS del efluente) ÷ g de MS consumida] x 100, con el efluente corregido para g MS de saliva.

**Digestibilidad verdadera de la MS (% del total de MS)** = {[ (g de MS consumida - (g de flujo de MS del efluente - g de MS microbiana)) ÷ g de MS consumida ] x 100, con el efluente corregido para g MS se saliva.

Los flujos de las fracciones nitrogenadas se calcularon de la siguiente manera:

**Consumo total de N (g/día)** = urea saliva (g / d) + N dietético (g / d).

**Flujo de NH<sub>3</sub> (g/día)** = [(N-NH<sub>3</sub> efluente en mg / dL × (flujo de efluente total en mL x 1 dL / 100 mL)]; (Bach y Stern, 1999).

**Flujo NNA (g/día)** = (flujo de N total efluente en g) - (N-NH<sub>3</sub> efluente en g).

**Flujo de N microbiano (g/día)** = (g de MS microbiana) × (% N en microorganismos ÷ 100).

**Flujo de N en la dieta (g/día)** = (NNA efluente en g) - (N microbiano de efluente en g).

**Flujo total de N (g/día)** = (flujo de N-NH<sub>3</sub> del efluente en g) + (flujo NNA en g).

La eficiencia bacteriana se calculó de la siguiente manera:

**Eficiencia bacteriana (mg de N / kg bacteriano realmente digerido)** = (N bacteriano efluente ÷ g de MO verdaderamente digerido) x 1,000, donde,

**N (g) bacteriano efluente** = [N total efluente (g / d) × (% N bacteriano en el N total efluente / 100)].

**% de N bacteriano en el N total del efluente** = [purina efluente (mg / g de N) ÷ purina bacteriana (mg / g de N)] x 100. (Soder *et al.*, 2016).

La producción diaria de CH<sub>4</sub> (mmol / d) se estimó mediante la siguiente ecuación:

**Concentración de CH<sub>4</sub>** en el volumen de aire (headspace) del fermentador (mmol / mL) × Flujo de gas CO<sub>2</sub> a través del espacio de cabeza del fermentador (20 ml / min) × 60 min × 24 h. (Soder *et al.*, 2016).

La **producción de metano** (mmol / g de MO consumido, FDN consumido NDF alimentada) se calcularon de la siguiente manera (alimentado OM utilizado como ejemplo): **mmol de salida de CH<sub>4</sub> / g de MO consumido** = [salida de CH<sub>4</sub> diaria (mmol / d) / g de MO consumido/d].

## 5.3. RESULTADOS Y DISCUSION

### 5.3.1. Composición de las dietas y digestibilidad de los nutrientes

La composición química de los ingredientes utilizados se presenta en la Tabla 5.1 y la composición de las raciones en la Tabla 5.2. Las raciones fueron diseñadas para cumplir o exceder las recomendaciones de nutrientes (salvo para PB de la dieta) del NRC (2001) para una vaca Holando Argentino de 3ra lactancia de parición de otoño en lactancia media con un PV de 600 kg, una producción de 30 kg/día de 3,5 % GB y 3,25 % PB, una pérdida de peso por día promedio de 200 gr/día y una CC al parto de 3,25/3,5. Las concentraciones de PB de las raciones promediaron 13,0; 16,1 y 19,2 % MS, y así se logró, en promedio, la diferencia inicialmente prevista de 3 unidades entre los tratamientos ya evaluados a campo (Capítulo 4). Las concentraciones de MO, FDN y FDA fueron relativamente similares para todos los tratamientos, y promediaron 94,1; 29,8 y 17,9% (base MS), respectivamente. Debido a que las dietas se formularon reemplazando la fuente principal de PB (harina de soja con alto contenido de PB) con una fuente de energía (grano de maíz molido), la reducción en el contenido de PB de la dieta entre tratamientos fue acompañada por un aumento de CNF y cenizas (similar a lo ocurrido a Soder y Gregorini (2010)). Sin embargo, el contenido de EN<sub>L</sub> entre tratamientos fue similar. Con respecto a las tasas de dilución de sólidos y líquidos, no se observaron diferencias entre tratamientos (5,0 % / hora y 10,0 % / hora, respectivamente), como así tampoco entre periodos o fermentadores, lo cual indica que las condiciones fueron similares en los diferentes momentos del ensayo. Lo mismo ocurrió con el tiempo de retención utilizado (20 horas).

El aumento de la PB en la dieta no tuvo un efecto significativo en la digestibilidad *in vitro* de la MS, de la MO y de la FDN y FDA ( $P = 0,75$ ;  $P = 0,54$ ;  $P = 0,65$  y  $P = 0,78$ , respectivamente; Tabla 5.5). Debido a que el enfoque principal del experimento fueron los niveles de PB en la dieta se observaron digestibilidades similares de la MS, MO y la fibra. Esta situación también fue reportada por Brito *et al.* (2007).

La digestibilidad aparente de la MS fue  $48,91 \pm 2,04$  % y de la MO  $71,08 \pm 1,64$  % en promedio (Tabla 5.5). Estos valores están, en general, de acuerdo con las de Bargo *et al.* (2003), quienes reportaron digestibilidades para la MS y la MO del 49,0 y 62,7%, respectivamente, para dietas con distinta relación forraje: concentrado en fermentadores de doble flujo continuo. La digestibilidad aparente de la FDN promedió  $79,03 \pm 1,93$  %, valor similar a Bargo *et al.* (2003) y

Soder y Gregorini (2010), lo que indica la buena calidad del forraje, y la de la FDA  $68,69 \pm 2,89$  % de digestibilidad, similar a lo observado por Wales *et al.* (2004).

Con respecto a la digestibilidad verdadera de la MS y de la MO, tampoco se observaron diferencias significativas entre los tratamientos evaluados ( $P = 0,27$  y  $P = 0,84$ , respectivamente). Esta situación fue reportada por Amaral *et al.* (2016) y contrario a lo ocurrido en Bargo *et al.* (2003). Para el caso de la digestibilidad verdadera de la MS, se lograron valores promedios de  $68,36 \pm 2,10$  % y para la MO de  $91,32 \pm 2,20$  %.

### 5.3.2. pH, AGV y metano.

A medida que el contenido de PB disminuyó de 19,16 a 13,00%, y los CNF aumentaron correspondientemente de 41,0 a 47,3% de la MS, el pH ruminal medio disminuyó linealmente ( $P < 0,001$ ), de 6,35 a 6,06 (Tabla 5.6). La misma tendencia se observó para el pH máximo y el mínimo. Este último llegó a valores cercanos a 5,80 para el tratamiento con menor PB (BPB) en la dieta.

**Tabla 5.5:** Efecto de la cantidad de proteína en la dieta sobre la digestibilidad aparente y real de los nutrientes durante la fermentación en un sistema de doble flujo continuo.

Ítem	Dietas <sup>1</sup>				Trat	Contrastes <sup>3</sup>			
	BPB	MPB	APB	EEM <sup>2</sup>		P	F	L	Q
<b>Digestibilidad aparente, %</b>									
MS	49,65	48,79	48,49	1,042	NS	NS	NS	NS	NS
MO	70,46	71,59	71,25	0,633	NS	NS	NS	NS	NS
FDN	79,36	78,86	78,69	0,469	NS	NS	NS	NS	NS
FDA	69,40	68,46	68,22	1,181	NS	NS	NS	NS	NS
<b>Digestibilidad verdadera, %</b>									
MS	67,68	68,47	69,10	1,608	NS	NS	NS	NS	NS
MO	89,31	92,08	92,62	1,068	NS	NS	NS	NS	NS

**Referencias:** MS, materia seca, MO, materia orgánica, FDA, fibra detergente ácido, FDN, fibra detergente neutra. <sup>abc</sup> Letras diferentes en igual fila indican diferencias significativas entre medias. \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ . <sup>1</sup> BPB: baja proteína bruta; MPB: media proteína bruta, APB: alta proteína bruta. <sup>2</sup> EEM: error estándar de la media. <sup>3</sup>Contrastes: Trat (tratamiento); P (periodo); F (fermentador); L (respuesta lineal); Q (respuesta cuadrática).

**Tabla 5.6:** Efecto de la cantidad de proteína en la dieta sobre el pH y la concentración de AGV durante la fermentación en un sistema de doble flujo continuo.

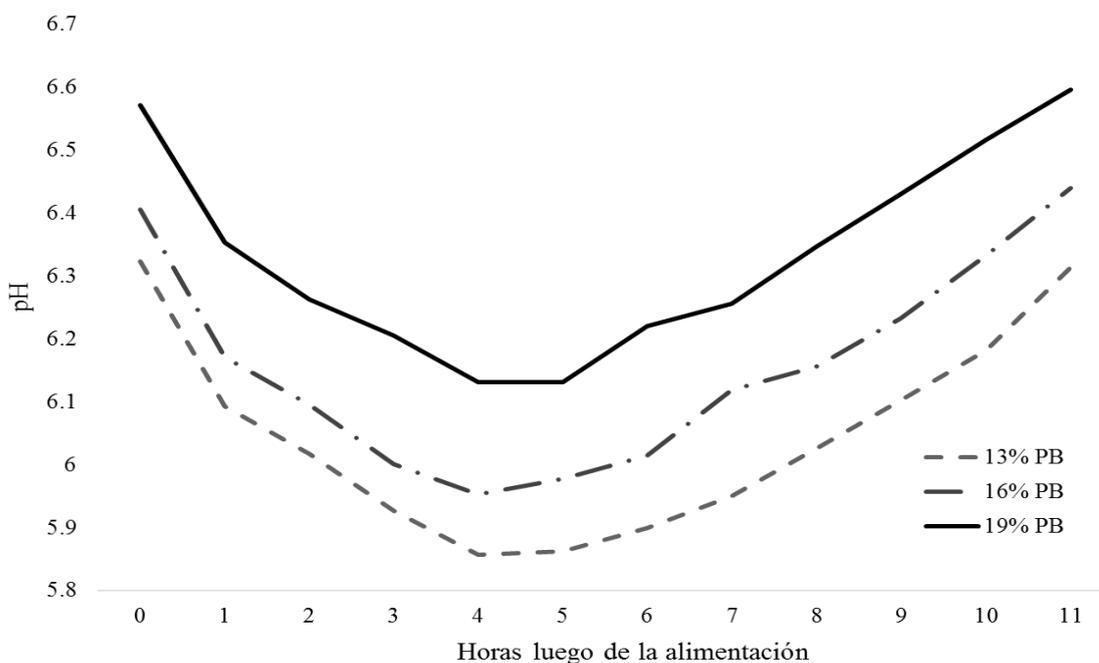
Ítem	Dietas <sup>1</sup>				Contrastes <sup>3</sup>				
	BPB	MPB	APB	EEM <sup>2</sup>	Trat	P	F	L	Q
<b>pH</b>									
Media	6,03 <sup>a</sup>	6,19 <sup>b</sup>	6,35 <sup>c</sup>	0,004	***	NS	NS	***	NS
Mínimo	5,82 <sup>a</sup>	5,99 <sup>b</sup>	6,13 <sup>ab</sup>	0,002	***	NS	NS	***	NS
Máximo	6,45 <sup>a</sup>	6,60 <sup>b</sup>	6,70 <sup>c</sup>	0,001	***	NS	NS	***	**
Tiempo pH < 6, min	675,27 <sup>c</sup>	104,03 <sup>b</sup>	0,00 <sup>a</sup>	3,025	***	NS	NS	***	***
AGV totales, mM / L	82,87	79,44	74,15	1,625	NS	NS	NS	+	NS
<b>AGV individuales, mol/100mol</b>									
Acetato	60,48	64,02	67,03	1,208	NS	NS	NS	NS	NS
Propionato	25,77	22,20	20,03	0,731	+	NS	NS	*	NS
Butirato	11,92	12,22	11,61	0,433	NS	NS	NS	NS	NS
Iso-butilato	0,56 <sup>a</sup>	0,59 <sup>a</sup>	0,65 <sup>b</sup>	0,008	*	NS	NS	*	NS
Valerato	2,03	2,11	2,33	0,111	NS	NS	NS	NS	NS
Iso-valerato	2,91 <sup>b</sup>	3,05 <sup>b</sup>	2,40 <sup>a</sup>	0,068	*	NS	NS	*	*
A : P	2,35 <sup>a</sup>	3,00 <sup>b</sup>	3,36 <sup>b</sup>	0,098	*	NS	NS	*	NS

**Referencias:** <sup>abc</sup> Letras diferentes en igual fila indican diferencias significativas entre medias. \* P < 0,05; \*\* P < 0,01; \*\*\* P < 0,001, +: P < 0,1 (tendencia). <sup>1</sup> BPB: baja proteína bruta; MPB: media proteína bruta, APB: alta proteína bruta. <sup>2</sup> EEM: error estándar de la media. <sup>3</sup> Contrastes: Trat (tratamiento); P (periodo); F (fermentador); L (respuesta lineal); Q (respuesta cuadrática).

La Figura 5.4 muestra el patrón de pH ruminal en diferentes momentos después de la alimentación. Al evaluar el pH a través del tiempo, no se observaron interacciones entre los tratamientos y el tiempo (P > 0,05). Los picos de pH más bajos para los tratamientos con menor contenido de PB fueron a las 4 horas y para el tratamiento con mayor contenido de PB entre las 4 y 5 horas luego de la alimentación. Este tipo de patrón se ha descrito previamente en fermentadores de cultivo continuo alimentados con raciones con diferentes contenidos de PB (Amaral *et al.*, 2016).

Un exceso de CNF fácilmente disponible puede generar una disminución del pH e incrementar

la producción de ácido láctico, lo que a su vez puede comprometer la eficiencia de la síntesis de proteína microbiana (Ipharraguerre *et al.*, 2002). Sin embargo, el pH ruminal para todos los tratamientos en el estudio actual fue mayor que el mínimo necesario para la función óptima del rumen (Hoover y Stokes, 1991; de Veth y Kolver, 2001). Por lo tanto, los cambios leves en el pH ruminal observados en este estudio, aunque fueron estadísticamente diferentes, pueden no haber sido biológicamente importantes. Esta premisa también se apoya en la falta de diferencias en la digestión de FDN (Soder y Gregorini, 2010).

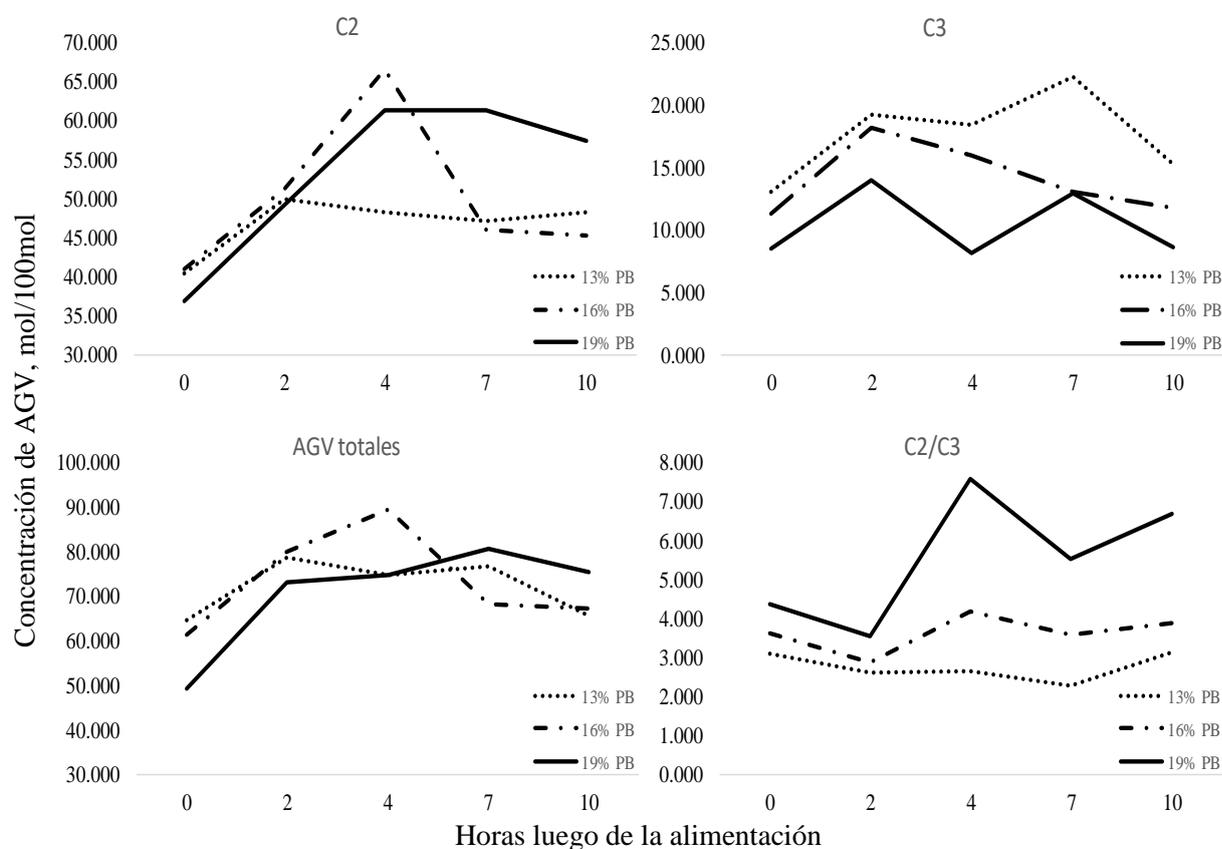


**Figura 5.4:** Efecto de los niveles de proteína bruta (PB) en el pH ruminal en diferentes momentos después de la alimentación en un sistema de doble flujo continuo.

Las concentraciones de AGV total (AGVT) y las proporciones molares de AGV individuales estuvieron dentro de los rangos informados de otros estudios de cultivo continuo (Bargo *et al.*, 2002; Bargo *et al.*, 2003; Vibart *et al.*, 2010; Soder *et al.*, 2012; Soder *et al.*, 2013; Soder *et al.*, 2016). Las concentraciones de AGVT no se vieron afectadas por los tratamientos evaluados ( $P = 0,12$ ), existiendo una tendencia a disminuir de forma lineal a medida que aumenta el nivel de PB ( $P < 0,1$ ), con un valor promedio de  $78,76 \pm 5,05$  mmol/L, similar a lo observado por Cunningham *et al.* (1996) y Christensen *et al.* (1993) y contrario a lo publicado por Sannes *et al.* (2002). Las proporciones molares de acetato (C2), butirato (C4) y valerato (C5) tampoco se vieron afectadas ( $P > 0,05$ ) por los contenidos de PB de la dieta (Tabla 5.6). La tendencia observada de un aumento para el propionato a medida que aumentó el contenido de PB de la dieta, estuvo relacionada con el contenido de maíz de la dieta, al ser un AGV más dependiente de los niveles de almidón. Lo

mismo se observó para el iso-valerato, existiendo una respuesta lineal y cuadrática ( $P = 0,003$ ). Para el caso del iso-butorato, se observó una respuesta lineal a una menor proporción a medida que disminuyó el contenido proteico de la dieta ( $P < 0,05$ ). La relación acetato: propionato fue mayor ( $P = 0,02$ ) para los tratamientos MPB y APB y aumentó linealmente con el contenido de PB de la dieta.

Los AGV son un producto final de la fermentación ruminal y están influenciados el nivel de ingesta, la digestibilidad ruminal (MS, MO y fibra), la tasa de pasaje, la composición de la dieta (Van Dung *et al.*, 2014). Por ello, en el presente estudio no era esperable que se produzcan cambios en los AGVT totales y en la proporción molar de los AGV individuales. De forma similar a nuestras observaciones, otros estudios han informado que el aumento de los niveles de PB en la dieta no tuvo un efecto significativo en la concentración total de AGV (Van Dung *et al.*, 2014; Amaral *et al.*, 2016). Al evaluar las concentraciones de los AGV a través del tiempo, en todos los casos se observaron diferencias según el horario e interacciones entre los tratamientos y el tiempo ( $P < 0,05$ ). En la Figura 5.5 se puede observar el comportamiento para AGVT, acetato, propionato y la relación entre los dos últimos.



**Figura 5.5:** Efecto de los niveles de proteína bruta (PB) sobre AGV en diferentes momentos después de la alimentación en un sistema de doble flujo continuo.

### 5.3.3. Metano y recuento de bacterias totales y metanogénicas.

No se observaron diferencias entre tratamientos en la emisión diaria de CH<sub>4</sub> (P = 0,49; Tabla 5.8), al igual que lo observado por Yunta Bernal (2010). La misma tendencia se observó para las emisiones evaluadas (mg/gMO; P = 0,50). No se observó un efecto significativo del horario de muestreo de CH<sub>4</sub> (P = 0,35; Figura 5.5), ni tampoco una interacción entre las dietas y el horario (P = 0,11). Al igual que lo ocurrido con la producción de metano, tampoco se observaron diferencias significativas entre tratamientos en la densidad de la población de bacterias totales y metanogénicas (Tabla 5.7).

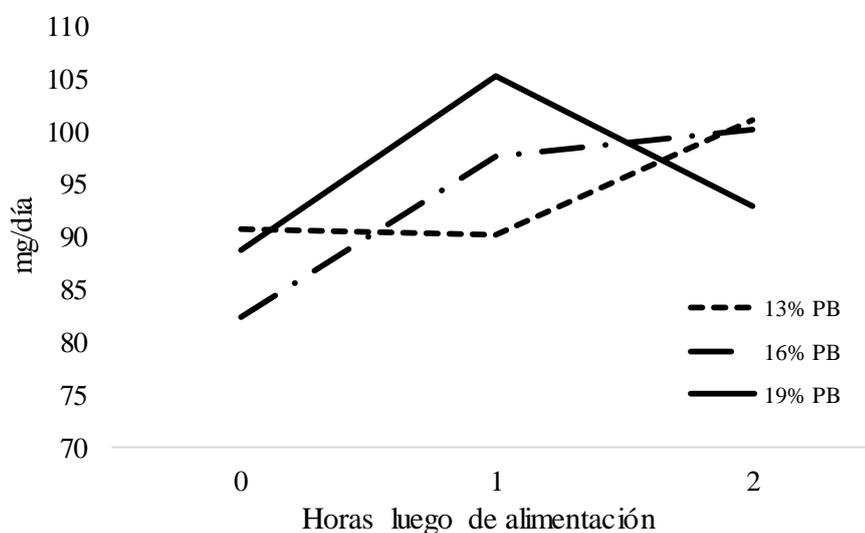
**Tabla 5.7:** Efecto de la cantidad de proteína en la dieta sobre la emisión de CH<sub>4</sub>, el recuento de bacterias totales y metanogénicas durante la fermentación en un sistema de doble flujo continuo.

Ítem	Dietas <sup>1</sup>				Contrastes <sup>3</sup>				
	BPB	MPB	APB	EEM <sup>2</sup>	Trat	P	F	L	Q
<b>Metano</b>									
mmol CH <sub>4</sub> /d	5,73	6,22	5,74	0,187	NS	NS	NS	NS	NS
mg CH <sub>4</sub> /d	91,88	99,85	92,14	3,004	NS	NS	NS	NS	NS
mg of CH <sub>4</sub> /g of MS	1,02	1,11	1,02	0,033	NS	NS	NS	NS	NS
mg of CH <sub>4</sub> /g of MO	1,06	1,15	1,07	0,035	NS	NS	NS	NS	NS
<b>Recuento de bacterias, Log<sub>10</sub> N° de copias/g</b>									
Bacterias totales	10,17	10,15	10,52	0,180	NS	NS	NS	NS	NS
Metanogénicas totales	8,64	8,69	8,69	0,197	NS	NS	NS	NS	NS

**Referencias:** <sup>abc</sup> Letras diferentes en igual fila indican diferencias significativas entre medias. \* P < 0,05; \*\* P < 0,01; \*\*\* P < 0,001; + : P < 0,1 (tendencia). <sup>1</sup> BPB: baja proteína bruta; MPB: media proteína bruta, APB: alta proteína bruta. <sup>2</sup> EEM: error estándar de la media. <sup>3</sup> Contrastes: Trat (tratamiento); P (periodo); F (fermentador); L (respuesta lineal); Q (respuesta cuadrática).

Según Yunta Bernal (2010), en la literatura no hay evidencia en cuanto a que el contenido de proteína en la ración ofrecida a las vacas pueda afectar o modificar la tasa de producción de los distintos AGV y, por lo tanto, la cantidad de metano producido. Por esta razón, la hipótesis en este experimento fue que no habría diferencias significativas entre los tres tratamientos estudiados. Al observar la evolución de la emisión de CH<sub>4</sub> en la Figura 5.6, el tratamiento con menor contenido proteico (BPB) tuvo el pico de producción de metano a las dos horas pos alimentación, mientras que MPB y APB a la hora, observándose un pico mayor para el tratamiento con contenido proteico

más elevado. Aunque no se pueda sacar una inferencia clara, en el tratamiento BPB el comportamiento del metano fue similar a la curva de concentración de acético y, probablemente, relacionado al mayor contenido de almidón en esta dieta.



**Figura 5.6:** Efecto de los niveles de proteína bruta (PB) en la producción de metano en diferentes momentos después de la alimentación en un sistema de doble flujo continuo.

#### 5.3.4. Metabolismo del nitrógeno.

Igual que lo observado por Soder y Gregorini (2010), la digestibilidad de la PB no se vio afectada por el contenido proteico en la dieta. Sin embargo, se observó una tendencia ( $P = 0,07$ ) a una respuesta lineal, siendo la digestibilidad menor a medida que el contenido de PB de la dieta fue mayor. Como era de esperar, hubo un efecto lineal sobre la concentración ruminal de  $N-NH_3$  ( $P < 0,001$ ) en respuesta al aumento de la PB de la dieta (Tabla 5.8). Esto ha sido informado previamente por Chanthakhoun *et al.* (2012), Chen *et al.* (2010) y Amaral *et al.* (2016), debido a que el  $N-NH_3$  ruminal es un producto final de la degradación de la proteína bruta. La misma respuesta se observó para la concentración de  $N-NH_3$  en el efluente, la cual disminuyó linealmente ( $P < 0,001$ ) al ser menor el contenido proteico de la dieta, observándose una concentración aproximadamente tres veces mayor en el tratamiento APB en comparación con el tratamiento BPB, disminuyendo de 12,14 a 7,85 y 4,94 mg N/100 ml a medida que disminuyó la PB en las dietas ofrecidas. Aunque esto fue más probablemente, en parte, debido a la reducción en el suministro de N al rumen a medida que disminuyó la PB, también es posible que la captura de N por parte de los microorganismos ruminales mejorara con una menor PB entregada en la dieta (McCormick *et al.*, 2001) debido al aumento de CNF. Esta situación significaría un mayor aporte de energía para

transformar N-NH<sub>3</sub> en proteína microbiana (Bargo *et al.*, 2003; Soder y Gregorini, 2010). Mehrez *et al.* (1977) y Owens *et al.* (1983) reportaron que una concentración ruminal de N-NH<sub>3</sub> de 2,4 mg/100 ml es la concentración mínima para un crecimiento microbiano adecuado. En el presente estudio los niveles de N-NH<sub>3</sub> se encuentran por encima de dicha concentración.

**Tabla 5.8.** Efecto de la cantidad de proteína en la dieta sobre el metabolismo del nitrógeno ruminal durante la fermentación en un sistema de doble flujo continuo.

Ítem	Dietas <sup>1</sup>				Contrastes <sup>3</sup>				
	BPB	MPB	APB	EEM <sup>2</sup>	Trat	P	F	L	Q
N-NH <sub>3</sub> , mg of N/dL	4,94 <sup>a</sup>	7,85 <sup>b</sup>	12,14 <sup>c</sup>	0,111	***	NS	NS	***	*
Digestibilidad PB, %	96,34	94,74	89,70	1,302	NS	NS	NS	+	NS
<b>Flujo de N, g/d</b>									
N total	2,16 <sup>a</sup>	2,26 <sup>b</sup>	2,39 <sup>c</sup>	0,004	**	NS	NS	***	+
N-NH <sub>3</sub>	0,18 <sup>a</sup>	0,29 <sup>b</sup>	0,45 <sup>c</sup>	0,004	***	NS	NS	***	*
NNA	1,98 <sup>b</sup>	1,97 <sup>b</sup>	1,95 <sup>a</sup>	0,002	*	NS	NS	**	NS
N bacteriano	1,86 <sup>b</sup>	1,72 <sup>b</sup>	1,41 <sup>a</sup>	0,041	*	NS	NS	*	NS
N de la dieta	0,10 <sup>a</sup>	0,24 <sup>b</sup>	0,53 <sup>c</sup>	0,008	**	NS	NS	***	*
<b>Eficiencia de síntesis de proteína microbiana, %</b>									
ESPMMS	28,16	27,15	23,71	1,007	NS	NS	NS	+	NS
ESPMMO	22,66	21,16	18,13	0,619	+	NS	NS	*	NS

**Referencias:** <sup>abc</sup> Letras diferentes en igual fila indican diferencias significativas entre medias. \* P < 0,05; \*\* P < 0,01; \*\*\* P < 0,001; + : P < 0,1 (tendencia). <sup>1</sup> BPB: baja proteína bruta; MPB: media proteína bruta, APB: alta proteína bruta. <sup>2</sup> EEM: error estándar de la media. <sup>3</sup> Contrastes: Trat (tratamiento); P (periodo); F (fermentador); L (respuesta lineal); Q (respuesta cuadrática).

Los flujos de N total y N-NH<sub>3</sub> aumentaron linealmente (P < 0,05 y P < 0,001, respectivamente) a medida que aumentó la PB de la dieta. Contrariamente, para el caso del NNA (N no NH<sub>3</sub>), se observó una disminución lineal (P = 0,01) a medida que el contenido de PB de la dieta fue mayor. Este resultado fue contrario a lo observado por Clark *et al.* (1992), quienes informaron una relación positiva entre el consumo de N en la dieta y el ingreso de NNA al intestino delgado, o Soder y Gregorini (2010) quienes observaron una tendencia a un mayor flujo de NNA a medida que el contenido de PB fue mayor.

El flujo de N bacteriano también disminuyó linealmente ( $P = 0,02$ ) a medida que se incrementó el contenido de PB de la dieta, siendo 32% mayor en el tratamiento con 13% PB con respecto al tratamiento con 19% PB.

La eficiencia de la síntesis de N bacteriano, medida como g N/kg MS y g N/kg MO verdaderamente digestibles, no se vio afectada por los tratamientos. Esta respuesta es similar a los resultados encontrados por Busquet *et al.* (2005), quienes no encontraron diferencias en la eficiencia bacteriana en un sistema de cultivo continuo alimentado con una dieta 50: 50 forraje y concentrado. Sin embargo, al evaluar la eficiencia con respecto a la MO, se observó una respuesta lineal ( $P = 0,03$ ) con respecto a la PB de la dieta, disminuyendo linealmente a medida que el contenido de PB aumentó. Esta tendencia y el mayor flujo de N de la dieta a medida que se incrementó el contenido de PB ( $P < 0,001$ ), indicaría que un 13% y 16 % de PB permitirían una mayor síntesis de proteína microbiana en el rumen y más allá de ese nivel, no habría ningún beneficio adicional de alimentar a mayor cantidad de PB de la dieta. De igual manera, Soder y Gregorini (2010) observaron que la eficiencia de la síntesis de N bacteriano disminuyó linealmente ( $P < 0,05$ ) a medida que la PB de la dieta aumentó. Por su parte, Christensen *et al.* (1993), Cunningham *et al.* (1996), Korhonen *et al.* (2002), y Reynal *et al.* (2003) no encontraron mejoras en la eficiencia microbiana al aumentar el contenido d PB de la dieta.

## 5.4. CONCLUSIONES

La suplementación de una dieta basada en niveles decrecientes de PB dio como resultado patrones alterados de fermentación ruminal, como la evidencia de los valores alterados de pH ruminal y los cambios en el metabolismo de parte de los AGV y N. Las dietas con 13% y 16% de PB proporcionaron efectos positivos sobre el flujo de N microbiano y una tendencia hacia una mejor eficiencia microbiana en el rumen; por lo tanto, fueron la mejor estrategia para una mejorar la utilización de N en el rumen. Más allá de ese nivel, no hubo más beneficios de alimentar una mayor PB en la dieta. Al mismo tiempo, la ración con mayor nivel de PB excedió las recomendaciones de NRC (2001) para dicho nutriente para el caso de vacas lecheras lactantes. Esta práctica no solo podría ser perjudicial para la fermentación, sino que también los suplementos proteicos suelen ser más caros que los suplementos energéticos, pudiendo generar innecesariamente un incremento en los costos de la ración. Además, un exceso de N que no se excreta a través de la leche, se eliminará por la orina y las heces, lo que es una preocupación a nivel ambiental.

## 5.5. REFERENCIAS

- Amaral, P.M.; Mariz, L.D.S.; Benedeti, P.D.B.; Silva, L.G.; Paula, E.M.; Monteiro, H.F. (2016). Effects of Static or Oscillating Dietary Crude Protein Levels on Fermentation Dynamics of Beef Cattle Diets Using a Dual-Flow Continuous Culture System. *Plos one*. **11** (12), 1-14.
- AOAC, (1990). Official Methods of Analysis. 15th ed. Association of Official Analytical Chemists: Arlington, VA.
- AOAC, (1998). Official methods of analysis. 16th edn. Association of Official Analytical Chemists: Arlington, VA.
- AOAC, (1999). Official methods of analysis. 17th edn. Association of Official Analytical Chemists: Arlington, VA.
- Bargo, F.; Muller, L.D.; Varga, G.A.; Delahoy, J.E.; Cassidy, T.W. (2002). Ruminant digestion and fermentation of high-producing dairy cows with three different feeding systems combining pasture and total mixed rations. *J. Dairy Sci.* **85**, 2964-2973.
- Bargo, F.; Varga, G.A.; Muller, L.D.; Kolver, E.S. (2003) Pasture intake and substitution rate effects on nutrient digestion and nitrogen metabolism during continuous culture fermentation. *J Dairy Sci.* **86**, 1330–1340.
- Brito, A.F.; Broderick, G.A.; Reynal, S.M. (2007). Effects of different protein supplements on omasal nutrient flow and microbial protein synthesis in lactating dairy cows. *J. Dairy Science* **90**, 1828–1841
- Busquet, M.; Calsamiglia, S.; Ferret, A.; Cardozo, P.W.; Kamel, C. (2005). Effects of Cinnamaldehyde and Garlic Oil on Rumen Microbial Fermentation in a Dual Flow Continuous Culture. *J. Dairy Sci.* **88**, 2508–2516
- Cárdenas, L. M., Chadwick, D.; Scholefield, D.; Fychan, R.; Marley, C.L.; Jones, R.; Bol, R.; Well, R.; Vallejo, A. (2007). The effect of diet manipulation on nitrous oxide and methane emissions from manure application to incubated grassland soils. *Atmos. Environ.* **41**, 7096–7107.
- Chaney, A.L.; Marbach, A.P. (1962). Modified reagents for determination of urea and ammonia, *Clin.Chem.* **8**(2), 130-132.

- Chanthakhoun, V.; Wanapat, M.; Berg, J. (2012). Level of crude protein in concentrate supplements influenced rumen characteristics, microbial protein synthesis and digestibility in swamp buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Livest Sci.* **144(3)**, 197–204. 37.
- Chen, S.C.; Paengkoum, P.; Xia, X.L.; Na-Lumpang, P. (2010). Effects of Dietary Protein on Ruminal Fermentation, Nitrogen Utilization and Crude Protein Maintenance in Growing Thai-indigenous Beef Cattle Fed Rice Straw as Roughage. *Journal of Animal and Veterinary Advances.* **9 (18)**, 2396–2400.
- Christensen, R.A.; Cameron, M.R.; Klusmeyer, T.H.; Elliot, J.P.; Clark, J.H.; Nelson, D.R.; Yu, Y. (1993). Influence of amount and degradability of dietary protein on nitrogen utilization by dairy cows. *J. Dairy Sci.* **76**, 3497–3513.
- Clark, J.H.; Klusmeyer, T.H.; Cameron, M.R. (1992). Microbial protein synthesis and flows of nitrogen fractions to the duodenum of dairy cows. *J. Dairy Sci.* **75**, 2304-2323
- Cunningham, K.D.; Cecava, M.J.; Johnson, T.R.; Ludden, P.A. (1996). Influence of source and amount of dietary protein on milk yield by cows in early lactation. *J. Dairy Sci.* **79**, 620–630.
- De Veth, M. J.; Kolver, E.S. (2001). Digestion of Ryegrass pasture in response to change in pH in continuous culture. *J. Dairy Sci.* **84**, 1449-1457.
- Dijkstra, J.; Oenema, O.; Bannink, A. (2011). Dietary strategies to reducing N excretion from cattle: Implications for methane emissions. *Curr. Opin. Environ. Sustainability.* **3**, 414–422.
- Friggens, N.C.; Oldham, J.D.; Dewhurst, R.J.; Horgan, G. (1998). Proportions of volatile fatty acids in relation to the chemical composition of feeds based on grass silage. *J Dairy Sci.* **81**, 1331-1344.
- Griswold, K.E., Hoover, W.H., Miller, T.K., Thayne, W.V. (1996). Effect of form of nitrogen on growth of ruminal microbes in continuous culture. *J. Anim. Sci.* **74**, 483–491.
- Hoover, W.H.; Stokes, S.R. (1991). Balancing carbohydrates and proteins for optimum rumen microbial yield. *J. Dairy Sci.* **74**, 3630-3644.
- Ipharraguerre, I.R.; Ipharraguerre, R.R.; Clark J.H. (2002). Performance of lactating dairy cows fed varying amounts of soyhulls as a replacement for corn grain. *J. Dairy Sci.* **85**, 2905–2912.

- Knapp, J.R.; Laur, G.L.; Vadas, P.A.; Weiss, W.P.; Tricarico, J.M. (2014). Invited review: Enteric methane in dairy cattle production: Quantifying the opportunities and impact of reducing emissions. *J. Dairy Sci* **97**, 3231–3261.
- Korhonen, M.; Vanhatalo, A.; Varvikko, T.; Huhtanen, P. (2002). Effect of protein source on amino acid supply, milk production, and metabolism of plasma nutrients in dairy cows fed grass silage. *J. Dairy Sci.* **85**, 3336–3351.
- Lee, C.; Hristov, A.N.; Heyler, K.S.; Cassidy, T.W.; Long, M.; Corl, B.A.; Karnati, S.K.R. (2011). Effects of dietary protein concentration and coconut oil supplementation on nitrogen utilization and production in dairy cows. *J. Dairy Sci.* **94**, 5544–5557.
- Makkar, H.P.S., Becker, K. (2007). Purine quantification in digesta from ruminants by spectrophotometric and HPLC methods. *British Journal of Nutrition* **81**, 107-112.
- Martin, C.; Morgavi, D.P.; Doreau, M. (2010). Methane mitigation in ruminants: from microbe to the farm scale. *Animal.* **4**, 351–365.
- McCormick, M.E.; Ward, J.D.; Redfearn, D.D.; French, D.D.; Blouin, D.C.; Chapa, A.M.; Fernandez, J.M. (2001). Supplemental dietary protein for grazing dairy cows: effect on pasture intake and lactation performance. *J. Dairy Sci.* **84**:896–907.
- Mehrez, A.Z.; Ørskov, E R.; McDonald, I. (1977). Rates of rumen fermentation in relation to ammonia concentration. *Br. J. Nutr.* **38**, 437–443.
- Murray, R.M.; Bryant, A.M.; Leng, R.A. (1976). Rates of production of methane in the rumen and large intestine of sheep. *British Journal of Nutrition.* **36**, 1–14.
- NRC. (2001). Nutrient Requirements of Dairy Cattle. 7th rev. ed. Natl. Acad. Sci., Washington, D.C.
- Owens, F.N.; Bergen, W.G. (1983). Nitrogen metabolism of ruminant animals: historical perspective, current understanding and future implications. *J Anim Sci.* **57**, 498-518.
- Reynal, S.M.; Broderick, G.A.; Ahvenjärvi, S.; Huhtanen, P. (2003). Effect of feeding protein supplements of differing degradability on omasal flow of microbial and undegraded protein. *J. Dairy Sci.* **86**, 1292-1305.

- Reynolds, C.K.; Kristensen, N.B. (2008). Nitrogen recycling through the gut and the nitrogen economy of ruminants: an asynchronous symbiosis. *J. Anim. Sci.* **86**, E293–E305.
- Sannes, R.A.; Messman, M.A.; Vagnoni D.B. (2002). Form of rumen-degradable carbohydrate and nitrogen on microbial protein synthesis and protein efficiency of dairy cows. *J. Dairy Sci.* **85**, 900–908.
- SAS (2003). SAS studio Institute, SAS Inst. Inc., Cary, NC
- Singh, K.M.; Pandya, R.P.; Tripathi, A.K.; Patel, G.R.; Parnerkar, S.; Kothari, R.K.; Joshi, C.G. (2014). Study of rumen metagenome community using qPCR under different diets. *Meta Gene.* **2**, 191–199.
- Soder, K.J.; Gregorini, P. (2010). Relationship between supplemental protein and ruminal fermentation of an orchardgrass-based herbage diet. *The Professional Animal Scientist.* **26**, 290–297.
- Soder, K.J.; Brito, A.F.; Rubano, M.D. (2012). Effect of incremental flaxseed supplementation of an herbage diet on methane output and ruminal fermentation in continuous culture. *J. Dairy Sci.* **95**, 3961–3969.
- Soder, K.J.; Brito, A.F.; Rubano, M.D. (2013). Effect of supplementing orchardgrass herbage with a total mixed ration or flaxseed on fermentation profile and bacterial protein synthesis in continuous culture. *J. Dairy Sci.* **96**, 3228–3237.
- Soder, K.J.; Brito, A.F.; Hafla, A.N.; Rubano, M.D. (2016). Effect of starchy or fibrous carbohydrate supplementation of orchardgrass on ruminal fermentation and methane output in continuous culture. *J. Dairy Sci.* **99**, 4464–4475.
- Van Dung, D., Shang, W., Yao, W. (2014). Effect of Crude Protein Levels in Concentrate and Concentrate Levels in Diet on In vitro Fermentation. *Asian-Australas J Anim Sci.* **27(6)**, 797–805.
- Van Soest, P.J.; Robertson, J.B.; Lewis, B.A. (1991). Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* **74**, 3583–3597.
- Vibart, R.E.; Washburn, S.P.; Fellner, V.; Poore, M.H.; Green, J.T.Jr.; Brownie, C. (2007).

- Varying endophyte status and energy supplementation of fresh tall fescue in continuous culture. *Anim. Feed Sci. Technol.* **132**, 123–136.
- Vibart, R.E.; Burns, J.C.; Fellner, V. (2010). Effect of replacing total mixed ration with pasture on ruminal fermentation. *The Professional Animal Scientist.* **26**, 435–442.
- Wales, W.J.; Kolver, E.S.; Thorne, P.L.; Egan, A.R. (2004). Diurnal variation in ruminal pH on the digestibility of highly digestible perennial ryegrass during continuous culture fermentation. *J. Dairy Sci.* **87**, 1864–1871.
- Weller, R.A.; Pilgrim, A.F. (1974). Passage of protozoa and volatile fatty acids from the rumen of the sheep and from a continuous in vitro fermentation system. *Br. J. Nutr.*, **32**, 341-351.
- Yu, Z.; Morrison, M. (2004). Improved extraction of PCR-quality community DNA from digesta and fecal samples. *Biotechniques*, **36(5)**, 808-12.
- Yunta Bernal, C. (2010). Methane production of dairy cows fed cereals with or without protein supplement and high quality silage. Tesis. Swedish University of Agricultural Science Department of Animal Nutrition and Management. [https://stud.epsilon.slu.se/1792/1/yunta\\_bernal\\_c\\_100924.pdf](https://stud.epsilon.slu.se/1792/1/yunta_bernal_c_100924.pdf)
- Zinn, R.A.; Owens, F.N. (1986). A rapid procedure for purine measurement and its use for estimating net ruminal protein synthesis. *Can. J. Anim. Sci.* **66**, 157.

## CAPITULO 6: DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES

### 6.1. DISCUSIÓN GENERAL

El manejo nutricional tiene un impacto directo en la cantidad, forma y rutas en que el animal excreta los nutrientes. Las dietas diseñadas para hacer el mejor uso de la capacidad de los rumiantes para evitar que el N sea excretado y, por lo tanto, incorporarlo como proteína microbiana de alta calidad, mejorarán la utilización del N y minimizarán el impacto ambiental.

El análisis realizado en el capítulo 2 a través de la modelización de sistemas reales, permitió conocer de la situación local actual con respecto a los niveles de PB frecuentemente utilizados, y su impacto en la EUN. Al evaluar los niveles de PB utilizados en las dietas entregadas a vacas en ordeño en 122 sistemas reales de la Argentina, los valores estuvieron cercanos a los recomendados por el NRC (alrededor del 18% PB). Sin embargo, los mismos fueron altos con respecto a las recomendaciones obtenidas en base a la revisión bibliográfica realizada para dietas que permitan una mejor EUN y, como resultado, una menor eliminación de N al ambiente (capítulo 3). Además, las EUN observadas en nuestros sistemas fueron menores a las deseadas. Esta situación manifiesta que aún quedan muchas estrategias por hacer para mejorar este indicador. Sin embargo, aquellos sistemas reales con mayor EUN mostraron una tendencia hacia una mayor emisión de CH<sub>4</sub> entérico por vaca, por lo tanto, una mejora en la EUN podría estar asociada a un aumento en la emisión de CH<sub>4</sub> entérico. Esta situación significa que puede existir un intercambio de emisiones contaminantes, y demuestra la necesidad de evaluar estrategias que permiten una menor excreción de N al ambiente, en conjunto con una menor emisión de CH<sub>4</sub> entérico.

La revisión sistemática realizada en el capítulo 3 permitió generar una síntesis de la evidencia disponible para proseguir con el análisis en profundidad de las relaciones entre las variables. En las últimas dos décadas se han llevado a cabo un número importante de estudios nutricionales que consideran el efecto de la PB de la dieta sobre la producción de leche y su composición química. Los primeros trabajos (1996 a 2001) fueron realizados con énfasis en la cuestión productiva, pero a partir del 2001 se comenzó a evaluar el efecto sobre la excreción de N en orina y heces y su posible impacto ambiental. Si bien en algunas variables se observó una baja variabilidad de respuesta entre los estudios evaluados, la PL individual y la EUN tuvieron una respuesta variable, siendo ambas variables de importancia para el costo de la dieta y el resultado económico final. Sin

embargo, como se discutió anteriormente, una mejora en la dieta para obtener menor excreción de N puede traer aparejado una mayor emisión de CH<sub>4</sub>. Por dicha razón, recientemente (2007 en adelante), se comenzó a tener en cuenta el efecto de una mejora en la EUN sobre la excreción de N y sobre la emisión de CH<sub>4</sub> entérico.

Si bien la reducción del contenido de proteínas de la dieta disminuye la excreción de N, dicho efecto es menos claro aún con respecto a la emisión de CH<sub>4</sub> entérico, observándose justamente que a veces, al mejorar la EUN, aumenta la emisión de dicho GEI. Según Dijkstra *et al.* (2011), es posible realizar cambios en la dieta para disminuir la excreción de N y al mismo tiempo la emisión de CH<sub>4</sub>. Sin embargo, estas relaciones simuladas por los autores aún no han sido del todo confirmadas por los trabajos de investigación realizados. En base a esta situación, se plantearon los ensayos *in vivo* e *in vitro* desarrollados en el capítulo 4 y 5 de la tesis, respectivamente.

Con respecto a las evaluaciones realizadas a campo en el capítulo 4, los resultados indican que las dietas evaluadas afectaron claramente la producción individual y la utilización de N en las vacas lecheras. Sin embargo, el CMS y la digestibilidad de la MS y la MO no fueron afectadas, al igual que lo observado por varios autores (Cunningham *et al.*, 1996; Leonardi *et al.*, 2003, Colmenero y Broderick, 2006). Lo mismo se observó en el ensayo con fermentadores (capítulo 5), en donde la digestibilidad aparente y real de la MS y la MO, al igual que la real de la PB, no se vieron afectadas por las diferentes dietas. Por lo tanto, se podría concluir que la variación en la producción de leche se explicó por el consumo de PB, sin ningún efecto aparente debido a la degradabilidad de las proteínas. Sin embargo, se pudo observar una tendencia a una mayor eficiencia en la síntesis de proteína microbiana a nivel ruminal, a medida que el consumo de PB fue menor. No obstante, dicha respuesta no se vio reflejada en una mayor productividad.

El aumento en el consumo de N de 498 a 609 g N/d mejoró la producción de leche en 2,26 kg/d y de 609 a 723 g N/d mejoró la producción de leche en 2,52 kg/d. Estos resultados concuerdan con estudios recientes que sugieren que las proteínas y no la energía, podrían ser el primer nutriente limitante para la producción de leche. Sin embargo, se debe tener en cuenta que los resultados obtenidos fueron con vacas luego del pico de lactancia. Por lo tanto, el aumento lineal en PL puede estar explicado por los requerimientos proteicos diferenciales de dicha etapa con inicio y final de lactancia. Al principio de la lactancia, las vacas pierden peso a medida que las reservas de energía son atacadas para satisfacer la demanda energética para la lactancia. Al mismo tiempo, debido a que el rendimiento de proteínas de la leche disminuye más tarde en la lactancia, la necesidad de PB en la dieta disminuye.

Con respecto a la calidad de la leche, los tratamientos no afectaron el porcentaje de GB, pero si la producción de GB, el porcentaje de PBL y la producción de PBL, los cuales fueron mayores al incrementarse el contenido proteico de la dieta. Un factor no tenido en cuenta fue el relacionado al mérito genético de los animales, específicamente en cuanto al porcentaje de PB de la leche. Del análisis realizado en vacas del rodeo de la EEA del INTA Rafaela, del cual se seleccionaron los correspondientes al ensayo de campo, se estaría evidenciando cierto “techo” en la PB de la leche de 3,32% como promedio de la lactancia, constituyéndose en una limitante o condicionante a la respuesta productiva. Al mismo tiempo, al disminuir el contenido de PB, se logró una disminución de NUL, y un aumento de la EUN. Los valores más deseables de ambos indicadores fueron obtenidos en el tratamiento que contenía menos PB en la dieta (13%) y los valores menos deseados en el de mayor contenido de PB (19%).

Con respecto a la utilización y destino del N consumido, al alimentar dietas basadas en heno de alfalfa y silaje de maíz, con harina de soja como la principal fuente de proteína, los resultados observados en el ensayo a campo, confirman que se produjeron cambios importantes en la eliminación de N al aumentar el consumo de dicho nutriente. Con consumos por encima de los 500 g/día se produce un cambio en relación con la forma en que se excreta el N, ya que en el nivel de CN del tratamiento con menor contenido proteico, la excreción de N en heces es la principal vía de eliminación de N, luego de la secreción de N en leche. Por encima de este valor, al igual que en estudios previos, la eliminación de N en orina aumenta linealmente y se transforma en la vía de excreción de N principal, luego de la secreción de N en leche y la eliminación por heces.

Estas tendencias se ilustran claramente en la Figura 6.1. Esta respuesta resulta en una disminución sustancial en la EUN a medida que el contenido de PB en la dieta aumentó de 13,0 a 19,1%. Sin embargo, la emisión de CH<sub>4</sub> entérico no se vio modificada por las diferencias obtenidas en EUN. Por lo tanto, aquellas dietas que permitieron una mayor EUN, no generaron un aumento en la emisión de CH<sub>4</sub>. Esta información podría ser importante en los intentos de simular la excreción de N en vacas en lactancia usando modelos matemáticos y/o definir estrategias para redirigir la excreción de N.

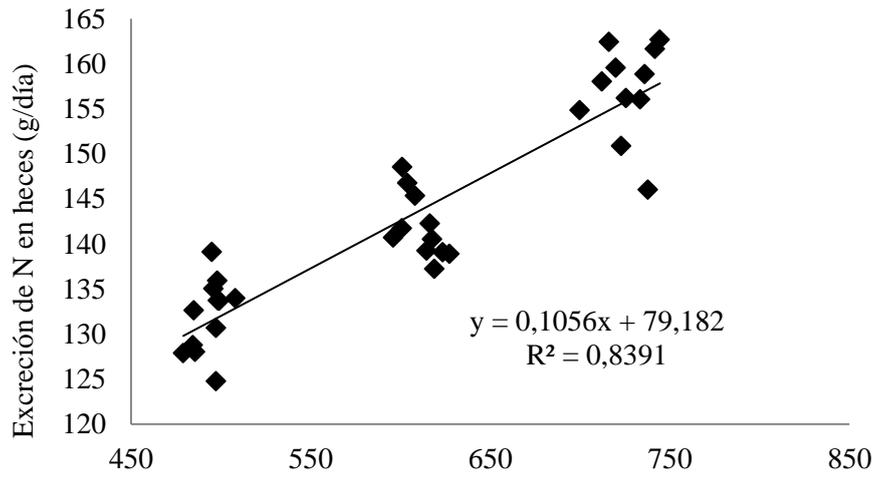


Fig. 6.1 a

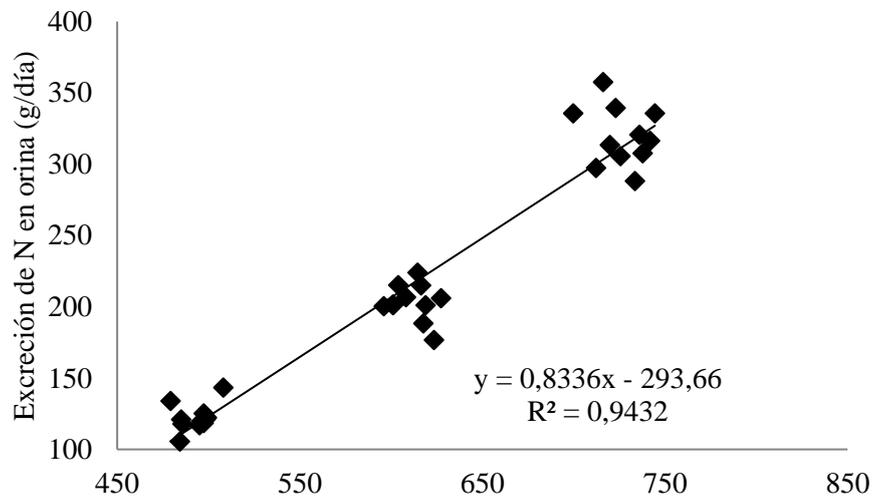


Fig. 6.1 b

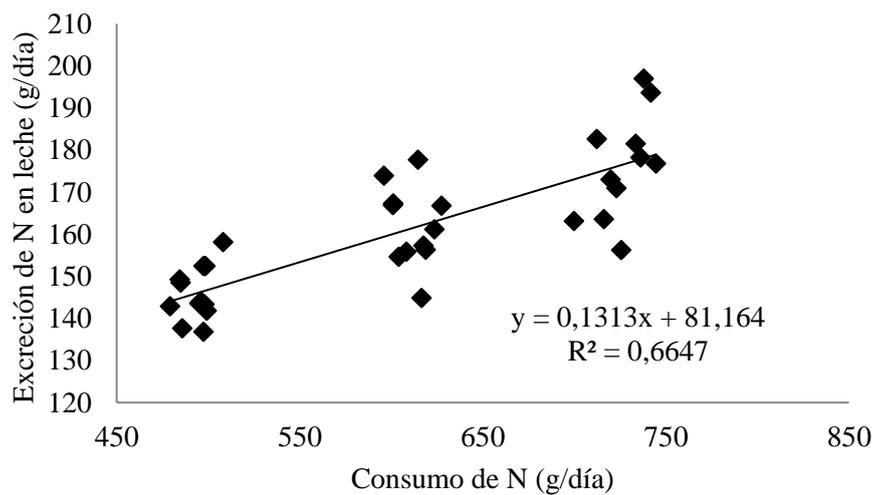


Fig. 6.1 c

**Figura 6.1:** Relación entre el consumo de nitrógeno y la excreción de nitrógeno en heces (6.1a), orina (6.1b) y leche (6.1c) en vacas lecheras que recibieron un bajo, medio o alto nivel de proteína bruta en la dieta.

El aumento en los niveles de PB en las dietas es difícil de justificar, ya que existen ganancias marginales en términos de producción animal, pero un aumento exponencial en términos de contaminación. Si el costo de las fuentes suplementarias de proteína es alto, la productividad máxima puede no ser el nivel más económico para la producción. Sin embargo, en el caso del ensayo a campo, si bien el costo de la ración fue mayor a medida que aumentó el porcentaje de PB de la dieta, debido a que la harina de soja fue el insumo de mayor costo unitario de la ración, el hecho de aumentar la PB de la dieta y que ello produjera un aumento de la producción de leche, permitió una disminución en la participación de los costos de alimentación, logrando un mayor margen de ganancia neta por vaca. Sin embargo, con el aumento de la PB de la dieta, la excreción de N total y N en forma de urea aumentó, generando mayor riesgo de lixiviación de  $\text{NO}_3^-$  y de volatilización  $\text{NH}_3$  y de  $\text{N}_2\text{O}$ . Por lo tanto, el costo potencial de la lixiviación de  $\text{NO}_3^-$  fue mayor a medida que aumentó el porcentaje de PB de la dieta, al igual que el costo potencial por la cantidad de  $\text{N}_2\text{O}$  que se emitiría a la atmósfera en forma de  $\text{CO}_{2\text{eq}}$ . Si bien en la actualidad, la industria lechera de Argentina no está obligada a pagar por sus externalidades negativas en sus sistemas lecheros, es posible que en un futuro cercano existan impuestos que tributen sobre dichas variables, pudiendo tener a futuro, un impacto sobre el margen bruto del productor lechero.

Por lo tanto, el análisis de los datos ha mostrado que la economía de N del animal puede ser manipulada para reducir la excreción de N. Sin embargo, la producción de leche fue afectada de forma negativa al mejorar los indicadores ambientales. Consecuentemente, las dietas que contenían un 19,1% de PB permitieron la producción máxima en vacas lecheras, pero con una mayor excreción de N al medio ambiente en comparación con las dietas con menor contenido de PB y un mayor costo ambiental. Al disminuir el contenido de PB, se logró una disminución de NUL, una menor excreción de N vía orina, en menor medida vía heces y un aumento de la eficiencia en el uso del N. Al mismo tiempo, una mejora en la EUN no tuvo un efecto negativo ni positivo sobre la emisión de  $\text{CH}_4$  entérico. Los resultados también confirmaron que el N urinario aumenta linealmente como resultado del NUL. Ello permite demostrar su utilidad como indicador de la eficiencia de utilización del N, al igual que lo observado por la revisión sistemática realizada, en donde se obtuvo una alta correlación negativa entre la concentración de NUL y la EUN.

## **6.2. INVESTIGACIÓN FUTURA**

La lechería deberá reflejar un proceso de intensificación sostenible que beneficie a los animales, a los agroecosistemas y la humanidad a través de la producción de nutrientes clave para

la alimentación humana. Los tambos continuarán aumentando en escala para optimizar la eficiencia y reducir los costos de producción. Sin embargo, dicho proceso puede verse afectado por regulaciones ambientales, el ordenamiento territorial y las restricciones del mercado.

La nutrición animal es una importante herramienta de manejo para reducir las pérdidas de N al ambiente. Por esta razón, es importante entender la partición de N en la vaca para proporcionar pautas y modelos que permitan controlar la eliminación de N. Una dieta que maximice la producción de leche puede ser diferente a una dieta que maximice la eficiencia o la rentabilidad. Después de un considerable esfuerzo de investigación, los niveles utilizados en esta tesis permitieron describir las respuestas diferenciales en la excreción de N cuando diferentes cantidades de PB o N fueron entregadas a vacas lecheras. Sin embargo, las respuestas productivas y económicas fueron de la mano, y contrarias a aquellas que permitirían un menor riesgo de contaminación ambiental con respecto al N. Por lo tanto, sería necesario continuar explorando niveles o estrategias de alimentación que logren ir hacia una misma dirección, ya sea través de ensayos a campo o a través de información obtenida en sistemas reales. En base a este último punto, las revisiones sistemáticas y la modelización a través de datos reales, son claves.

De manera más general, los esfuerzos para mitigar una emisión a veces pueden conducir a mayores emisiones de otros contaminantes, o del mismo contaminante en una etapa diferente; esto se conoce como intercambio de contaminación (“pollution swapping” en inglés; Monteny *et al.*, 2006; Ledgard *et al.*, 2019). Consecuentemente, habría que ser precavidos en la implementación de estrategias que sólo tiendan a aumentar la EUN, ya que podrían ser perjudiciales con respecto a las emisiones de CH<sub>4</sub>. Para ello se precisan realizar evaluaciones en conjunto, y así, a futuro, poder identificar dietas o estrategias de manejo que sean beneficiosas para ambos indicadores ambientales.

Además, debido a las condiciones climáticas registradas en la cuenca lechera santafesina en los últimos años, no fue posible realizar el trabajo de campo bajo condiciones de pastoreo. Sería conveniente, en futuros trabajos de investigación, aplicar tratamientos bajo pastoreo y de esta manera representar a un mayor número de dietas comúnmente utilizadas en la región. Dentro de las opciones de pastoreo, sería bueno explorar en la región la utilización de recursos forrajeros tolerantes a condiciones de anegamiento extremas, como las que se han presentado en los últimos 3 años. Asimismo, es posible cambiar o redirigir la excreción de N en las heces y la orina, cambiando la fuente y la disponibilidad de almidón en el rumen, aunque se requiere más investigación, especialmente bajo el pastoreo. Al mismo tiempo, es necesario realizar estudios

sobre el balance de N en la diversa genética de vacas que se encuentran en la región, con la finalidad de alcanzar una mayor adaptación a las condiciones climáticas extremas y una mayor EUN con un mejor resultado económico global.

Por último, el potencial de utilizar el NUL como un predictor de la EUN y la excreción de N, es de particular interés (Jonker *et al.*, 1998; Hoekstra *et al.*, 2020), especialmente para mejorar estratégicamente la utilización de N y el rendimiento animal utilizando técnicas sencillas y económicas, pudiendo además estar directamente relacionado con el potencial de una dieta para contribuir a la excreción al ambiente y, en consecuencia, a la lixiviación de NO<sub>3</sub> hacia aguas subterránea. La evaluación de dicho indicador en sistemas lecheros reales sería clave para poder continuar con el conocimiento y monitoreo de los niveles de PB, las EUN y los riesgos de contaminación en los tambos de Argentina. Para ello, el trabajo de investigación realizado integrado a otros datos publicados o disponibles localmente será utilizado para desarrollar un modelo mecanicista de utilización del N, pudiendo proporcionar herramientas útiles para a predicción de su excreción al ambiente.

Los efectos combinados de un aumento en el costo de la proteína de la dieta y la legislación introducida en varios países sobre el almacenamiento y la aplicación de estiércol y purines han resultado en un renovado interés por reducir los niveles de proteína en las dietas de vacas lecheras (Sinclair *et al.*, 2014) y por eso estos impactos referidos deben ser estudiados.

### **6.3. CONCLUSIONES**

El contenido de PB en la dieta es el factor más importante que determina la eficiencia en el uso del N, y por lo tanto la magnitud de las pérdidas de N en el ambiente. Sin embargo, disminuir la concentración de PB en la dieta puede resultar en una disminución de la productividad de los animales, del contenido proteico de la misma y por lo tanto del resultado económico de la empresa.

Proporcionar una cantidad adecuada de PB en la dieta es uno de los factores críticos en la nutrición de las vacas lecheras para lograr maximizar la producción y el resultado económico, minimizando el consumo de proteínas y la eliminación de N al ambiente mediante las excretas. Sin embargo, si bien un aumento del N entregado en la dieta puede permitir un mayor rendimiento en leche, con niveles de proteína en leche variables, la eficiencia de la conversión del N consumido en proteína de la leche disminuirá de manera esperable, al igual que aumentará la excreción de N, principalmente a través de la orina. Estos resultados muestran que la optimización del contenido

de PB deberá ser un balance entre los impactos económicos y ambientales en la producción de leche, ya que el consumo excesivo de N implicaría una mayor uremia, como resultado de una mayor producción de NH<sub>3</sub> en el rumen por los microorganismos que se perdería en forma de urea a través de la orina, aumentando las emisiones de NH<sub>3</sub> y N<sub>2</sub>O. Por lo tanto, ofrecer menores cantidades de proteínas podría generar una situación de “ganar-ganar”. Consecuentemente, reanalizando la literatura consultada y los resultados de esta tesis, la recomendación general para una dieta que permita una menor excreción de N al ambiente y con rendimientos aceptables en vacas Holstein sería ofrecer dietas con entre 15 a 16% de PB.

#### 6.4. REFERENCIAS

- Colmenero, O.J.J.; Broderick, G.A. (2006). Broderick effect of dietary crude protein concentration on milk production and nitrogen utilization in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* **89**, 1704-1712.
- Cunningham, K.D.; Cecava, M.J.; Johnson, T.R.; Ludden, P.A. (1996). Influence of Source and Amount of Dietary Protein on Milk Yield by Cows in Early Lactation. *J Dairy Sci.* **79**, 520-630.
- Dijkstra, J.; Oenema, O.; Bannink, A. (2011). Dietary strategies to reducing N excretion from cattle: implications for methane emissions. *Current Opinion in Environmental Sustainability*, **3**, 414–422.
- Hoekstra, N.; Holshof, G.; Zom, R.; Philipsen, B.; Schils, R.; van Eekeren, N. (2020). The Effect of Grazing System and Level of Concentrate Protein Feeding on Milk Production and N Use Efficiency of Dairy Cows on Peat Meadows. *Sustainability*. **12**, 1055.
- Jonker, J.S.; Kohn, R.A.; High, J. (2002). Use of Milk Urea Nitrogen to Improve Dairy Cow Diets. *J. Dairy Sci.* **85**, 939–946.
- Ledgard, S.F.; Wei, S.; Wang, X.; Falconer, S.; Zhang, N.; Zhang, X.; Ma, L. (2019). Nitrogen and carbon footprints of dairy farm systems in China and New Zealand, as influenced by productivity, feed sources and mitigations. *Agricultural Water Management*. **213**, 155–163.
- Leonardi, C.; Stevenson, M.; Armentano, L.E. (2003). Effect of two levels of crude protein and methionine supplementation on performance of dairy cows. *J. Dairy Sci.* **86**, 4033–4042.

Monteny G-J, Bannink A and Chadwick D 2006. Greenhouse gas abatement strategies for animal husbandry. *Agriculture, Ecosystems & Environment*. **112**, 163–170

Sinclair, K.D.; Garnsworthy, P.C.; Mann, G.E.; Sinclair, L.A. (2014). Reducir la proteína de la dieta en las dietas de vacas lecheras: implicaciones para la utilización del nitrógeno, la producción de leche, el bienestar y la fertilidad. *Animal*. **8 (2)**, 262-274.