

**Título de la tesis.**

COMPARACIÓN DE DIFERENTES MODELOS DE PREDICCIÓN DE  
EMISIÓN DE GASES DE EFECTO INVERNADERO POR VACAS  
LECHERAS ALIMENTADAS CON DIETAS BASADAS EN  
ENSILADO DE RAIGRÁS ITALIANO O ENSILADO DE HABA Y  
COLZA FORRAJERA.

Maroua Dachraoui

Fecha de entrega: 12 de Junio, 2015.

## **Agradecimientos**

Agradezco a Dios por darme la salud y la oportunidad de aprender.

Al Instituto Agronómico Mediterráneo de Zaragoza (IAMZ) por la financiación de mis estudios del máster.

Al Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (SERIDA) por poner a mi disposición sus instalaciones y medios técnicos necesarios para la realización del trabajo.

Un especial agradecimiento a mis directores de tesis, Dr Fernando Vicente Mainar y Dra Adela Martínez Fernández por aceptarme como becaria en su proyecto, por su gran apoyo, consejos y contribución de este trabajo.

A todos los componentes de la Área de Nutrición, Pastos y Forrajes del SERIDA: Doctores: Begoña de la Roza Delgado, Ana Soldado, Luis Royo y a Mara, María Antonia, Sagrario, Alfonso, Cristina, Isabel, José y Tito. Muchas gracias por su disponibilidad de tiempo, atención, y paciencia para atenderme y aclarar mis dudas a pesar de mis dificultades lingüísticas.

A Armando Occon, coordinador del máster, por la ayuda brindada, durante todo el tiempo, que he tenido el gusto de conocerlo.

A toda mi familia, con especial mención a mi abuela, mi madre y mi hermano a quién debo todo el éxito que he realizado, por su continuo apoyo y por su paciencia.

A Carne por todo el cariño y la ayuda que me ha dedicado para superar momentos complicados, por infundirme el ánimo necesario para concluir mi trabajo y para enseñarme a manejar la idioma.

A mis amigos Hamza, Meriam, Ines, Sahar y Vilma que desde la distancia siempre han estado dispuestos a ayudarme en lo que sea y a la hora que sea. Y a los buenos amigos

Carlos, Jorge, María José, Silvia, Petjon y todos que he podido conocer durante el tiempo que he estado en España, gracias por nuestra amistad.

De todo corazón, muchísimas gracias.

Los trabajos que componen esta memoria han sido financiados por el Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) a través de proyecto RTA2011-00112-00-00, cofinanciado FEDER



# Índice general

Capítulo	Página
<b>Agradecimiento</b> .....	<b>I</b>
<b>Índice general</b> .....	<b>V</b>
<b>Índice de tablas</b> .....	<b>VII</b>
<b>Índice de figuras</b> .....	<b>X</b>
<b>Índice de ecuaciones</b> .....	<b>XI</b>
<b>Abreviaturas</b> .....	<b>XII</b>
<b>Resumen</b> .....	<b>XIV</b>
<b>Summary</b>	<b>XV</b>
<b>Résumé</b> .....	<b>XVI</b>
<b>I. Introducción</b> .....	<b>3</b>
<b>II. Revisión bibliográfica</b> .....	<b>9</b>
II.1. Principales gases de efecto invernadero.....	<b>9</b>
II.1.1. Vapor de agua (H <sub>2</sub> O).....	<b>10</b>
II.1.2. Ozono (O <sub>3</sub> ).....	<b>10</b>
II.1.3. Dióxido de carbono (CO <sub>2</sub> ).....	<b>10</b>
II.1.4. El metano (CH <sub>4</sub> ).....	<b>11</b>
II.1.4.1. La producción de metano en la fisiología digestiva de los rumiantes...	<b>12</b>
II.1.4.2. Factores de variación de la producción de metano.....	<b>14</b>
II.1.4.2.1. Factores animales (Especie, tamaño y nivel de producción).....	<b>15</b>
II.1.4.2.2. Influencia de la dieta sobre la producción de CH <sub>4</sub> .....	<b>16</b>
II.1.5. Óxido de nitroso (N <sub>2</sub> O).....	<b>19</b>
II.1.5.1. Emisiones directas de N <sub>2</sub> O.....	<b>21</b>
II.1.5.2. Emisiones indirectas de N <sub>2</sub> O.....	<b>21</b>
II.2. Mitigación de los gases de efecto invernadero.....	<b>22</b>
II.2.1. Mitigación del metano.....	<b>22</b>
II.2.1.1. Estrategias nutricionales para la mitigación del metano.....	<b>22</b>
II.2.1.1.1. Uso de forrajes.....	<b>22</b>
II.2.1.1.2. Concentrado.....	<b>24</b>
II.2.1.2. Otras estrategias para la mitigación del metano.....	<b>25</b>
II.2.1.2.1. Adición de los lípidos.....	<b>25</b>

II.2.1.2.2. Aceites Esenciales.....	26
II.2.1.2.3. Probióticos.....	27
II.2.1.2.4. Ionóforos.....	27
II.2.1.2.5. Bromoetanosulfonato (BES).....	28
II.2.1. Mitigación del óxido de nitroso.....	29
II.3. Determinación de producción y emisión de metano.....	30
II.3.1. Técnicas directas.....	30
II.3.2. Técnicas indirectas.....	31
II.3.3. Métodos <i>in vitro</i> .....	32
II.3.3. Ecuaciones de predicción.....	32
<b>III. Materiales y métodos.....</b>	<b>37</b>
III.1. Lugar experimental.....	37
III.2. Animales y dietas.....	37
III.3. Diseño experimental.....	39
III.3.1. Energía Neta de Mantenimiento (NEI <sub>m</sub> ).....	40
III.3.2. Energía Neta de Gestación (NEI <sub>g</sub> ).....	40
III.3.3. Energía Neta de Lactación (NEI <sub>l</sub> ).....	40
III.3.4. Energía Neta debida al cambio de peso (NEI <sub>pv</sub> ).....	40
III.3.5. Energía Neta debida a la actividad de pastoreo (NEI <sub>p</sub> ).....	40
III.3.6. Energía Neta debida a la actividad de desplazamiento (NEI <sub>d</sub> ).....	41
III.4. Toma de muestras y análisis.....	41
III.5. Estimación de la producción de metano entérico.....	43
III.6. Estimación de las emisiones de metano producidas por la gestión del estiércol	45
III.7. Estimación de las emisiones de nitroso producidas por la gestión del estiércol	46
III.8. Estimación de las emisiones de nitroso producidas por la gestión del suelo....	47
III.9. Análisis estadística.....	47
<b>IV. Resultados.....</b>	<b>51</b>
IV.1. Ingestión de las dietas.....	51
IV.2. Metano entérico.....	52
IV.3. Estimaciones de gases debidas a las excretas.....	54
IV.3.1. Metano.....	54
IV.3.2. Óxido nitroso.....	54
IV.4. Estimaciones de gases debidas a la gestión del suelo.....	55

IV.5. Global de las emisiones.....	56
IV.6. Comparación de las diferentes ecuaciones de predicción de emisión de metano con el modelo del IPCC.....	57
<b>V. Discusión.....</b>	<b>65</b>
<b>VI. Conclusiones.....</b>	<b>71</b>
<b>VII. Referencias Bibliográficas.....</b>	<b>75</b>

## Índice de tablas

<b>Tabla</b>	<b>Título</b>	<b>Página</b>
<b>Tabla II.1.</b>	Fuentes antropogénicas de metano atmosférico (Tg o 10 <sup>6</sup> toneladas/año)	<b>12</b>
<b>Tabla II.2.</b>	Emisión de CH <sub>4</sub> por diferentes especies en España en 2012	<b>15</b>
<b>Tabla II.3.</b>	Variación de las emisiones de metano en vacas lecheras según el nivel de producción	<b>16</b>
<b>Tabla II.4.</b>	Producción de leche (kg/d) y estimaciones de la producción de metano entérico (g/kg de leche) de cada categoría de ensilado	<b>17</b>
<b>Tabla II.5.</b>	Resumen de los efectos de diferentes estrategias de mitigación de CH <sub>4</sub>	<b>29</b>
<b>Tabla III.1.</b>	Composición de ingredientes de las dietas TMR convencional y alternativa en los dos ensayos de primavera y otoño	<b>38</b>
<b>Tabla IV.1.</b>	Ingestión de TMR, pienso y materia seca (MS) y producción de leche según estación (E) y dieta (D)	<b>51</b>
<b>Tabla IV.2.</b>	Estimación de las emisiones de metano entérico según la estación (E) y la dieta (D) expresadas por día, por kg de alimento ingerido y por kg de leche producida	<b>52</b>
<b>Tabla IV.3.</b>	Estimación de la emisión de metano según la dieta (D) ofertada en cada estación (E)	<b>53</b>
<b>Tabla IV.4.</b>	Estimaciones de las emisiones de metano a partir del estiércol	<b>54</b>
<b>Tabla IV.5.</b>	Estimaciones de las emisiones de N <sub>2</sub> O directas e indirectas a partir del estiércol	<b>55</b>
<b>Tabla IV.6.</b>	Estimaciones de las emisiones de N <sub>2</sub> O debidas a la gestión del suelo	<b>55</b>
<b>Tabla IV.7.</b>	Estimación de las emisiones de metano entérico expresadas en CO <sub>2</sub> eq según la estación (E) y la dieta (D)	<b>56</b>
<b>Tabla IV.8.</b>	Estimaciones de las emisiones de metano entérico según el IPCC y las ecuaciones de Yates <i>et al.</i> (2000)	<b>57</b>
<b>Tabla IV.9.</b>	Estimaciones de las emisiones de metano según el IPCC y las ecuaciones de Mills <i>et al.</i> (2003)	<b>58</b>
<b>Tabla IV.10.</b>	Comparación de las medias de emisiones de metano entérico (MJ/d) de las ecuaciones de Mills <i>et al.</i> (2003) con el modelo del IPCC (2006)	<b>59</b>
<b>Tabla IV.11.</b>	Estimación de las emisiones de metano entérico según el IPCC y las ecuaciones de Ellis <i>et al.</i> (2007)	<b>60</b>

**Tabla IV.12.** Comparación de las medias de emisiones de metano entérico (MJ/d) de las ecuaciones de Ellis *et al.* (2007) con el modelo del IPCC (2006) **61**

## Índice de figuras

<b>Figura</b>	<b>Título</b>	<b>Página</b>
<b>Figura II.1.</b>	Proceso de producción del metano a partir de la fermentación de carbohidratos de la dieta	<b>13</b>
<b>Figura II.2.</b>	El ciclo del Nitrógeno	<b>20</b>

## Índice de ecuaciones

Ecuación	Página
<b>Ecuación 1</b> $NELm = k(0,08 \times PV^{0,75})$	40
<b>Ecuación 2</b> $NELg = \frac{[(0,00318 \times D - 0,0352) \times (\frac{PTN}{45})]}{0,218}$	40
<b>Ecuación 3</b> $NELl = kg\_leche\_día \times [0,3512 + (0,0962 \times \%grasa\_en\_leche)]$	40
<b>Ecuación 4</b> $NELp = 1,2kcal \times horas\_pastoreo \times PV^{0,75}$	40
<b>Ecuación 5</b> $NELd = \frac{0,62cal}{kgPV \times distancia\_metros}$	41
<b>Ecuación 6</b> $EN = (0,1569 \times EM) - 0,07$	42
<b>Ecuación 7</b> $EM = k \times MOD$	42
<b>Ecuación 8</b> $MOD = \%Materia\_Organicá \times (\frac{DMO}{100})$	42
<b>Ecuación 9</b> $DMO = 5,76 + (0,57 \times De) + (0,36 \times FND) + (0,5 \times PB)$	42
<b>Ecuación 10</b> $EM_{MAFF} = 10 \times (0,012 \times PB + 0,031 \times EE + 0,005 \times FB + 0,014 \times MELN)$	42
<b>Ecuación 11</b> $EM_{ADAS} = 11,78 + (0,0654 \times PB) + (0,0665 \times EE^2) - (0,0414 \times EE \times FB) - (0,018 \times CEN)$	42
<b>Ecuación 12</b> $EB(kcal/g) = 5,4 \times PB(g/kg) + 9,72 \times EE(g/kg) + 4,59 \times FB(g/kg) + 4,24 \times ELN(g/kg)$	43
<b>Ecuación 13</b> $EF = \frac{EB \times (\frac{Ym}{100}) \times 365}{55,65}$	43
<b>Ecuación 14</b> $Ym = -0,0038 \times DE^2 + 0,3501 \times DE - 0,8111$	43
<b>Ecuación 15</b> $CH_4 = MSI \times EF$	43
<b>Ecuación 16</b> $CH_4(Mj/d) = 5,93 + 0,92 \times MSI(kg/d)$	44
<b>Ecuación 17</b> $CH_4(Mj/d) = 8,25 + 0,07 \times EM(Mj/d)$	44
<b>Ecuación 18</b> $CH_4(Mj/d) = 7,30 + 13,13 \times N(kg/d) + 2,04 \times FAD(kg/d) + 0,33 \times Al(kg/d)$	44
<b>Ecuación 19</b> $CH_4(Mj/d) = 1,06 + 10,27 \times proporción\_forraje + 0,87 \times MSI(kg/d)$	44
<b>Ecuación 20</b> $CH_4(Mj/d) = 56,27 - 56,27e^{-0,028 \times MSI(kg/d)}$	44
<b>Ecuación 21</b> $CH_4(Mj/d) = 45,89 - 45,89e^{-0,003 \times EM(kg/d)}$	44
<b>Ecuación 22</b> $CH_4(Mj/d) = 45,98 - 45,98e^{[-(-0,0011) \times (\frac{Al}{FAD}) + 0,0045] \times EM(kg/d)}$	44

<b>Ecuación 23</b>	$CH_4(Mj/d) = 3,23 + 0,809 \times MSI(kg/d)$	<b>44</b>
<b>Ecuación 24</b>	$CH_4(Mj/d) = 8,56 + 0,39 \times Forraje(\%)$	<b>44</b>
<b>Ecuación 25</b>	$CH_4(Mj/d) = 4,08 + 0,0678 \times EM(Mj/d)$	<b>44</b>
<b>Ecuación 26</b>	$CH_4(Mj/d) = 3,14 + 2,11 \times FND(kg/d)$	<b>44</b>
<b>Ecuación 27</b>	$CH_4(Mj/d) = 5,87 + 2,43 \times FAD(kg/d)$	<b>44</b>
<b>Ecuación 28</b>	$CH_4(Mj/d) = 1,21 + 0,0588 \times EM(Mj/d) + 0,0926 \times forraje(\%)$	<b>45</b>
<b>Ecuación 29</b>	$CH_4(Mj/d) = 1,64 + 0,0396 \times EM(Mj/d) + 1,45 \times FND(kg/d)$	<b>45</b>
<b>Ecuación 30</b>	$CH_4(Mj/d) = 2,16 + 0,493 \times MSI(kg/d) - 1,36 \times FAD(kg/d) + 1,97 \times FND(kg/d)$	<b>45</b>
<b>Ecuación 31</b>	$CH_4(Mj/d) = 1,36 + 1,21 \times MSI - 0,825 \times concentrado(\%) + 12,8 \left( \frac{FND}{MSI} \right)$	<b>45</b>
<b>Ecuación 32</b>	$CH_{4Estiércol} = VS \times 0,67 \times B_0 \times \frac{MCF}{100} \times EU$	<b>45</b>
<b>Ecuación 33</b>	$VS = \left[ EB_{ingerid} \times \left( 1 - \frac{Digestibilidad - EB}{100} \right) + (Energía - Orina) \right] \times \left( \frac{1 - Cen}{18,45} \right)$	<b>45</b>
<b>Ecuación 34</b>	$kgN_2O/vaca = 0,48 \times \frac{kgPV}{1000} \times EU \times EF \times \frac{44}{28}$	<b>46</b>
<b>Ecuación 35</b>	$kgN_2O/vaca = N_{volatil} \times EF \times \left( \frac{44}{28} \right)$	<b>46</b>
<b>Ecuación 36</b>	$kgN_2O_{volatil}/vaca = 0,48 \times \frac{kgPV}{1000} \times EU \times \frac{Fracción_{volatil}}{100}$	<b>46</b>
<b>Ecuación 37</b>	$N - N_2O_{DIRECTO} = N_{APORTES} + N_{SUELO\_ORGÁNICO} + N_{PASTOREO}$	<b>47</b>
<b>Ecuación 38</b>	$N_{APORTES} = (F_{SN} + F_{ON} + F_{CR} + F_{SOM}) \times EF_1$	<b>47</b>
<b>Ecuación 39</b>	$N_{SUELO\_ORGÁNICO} = F_{OS} \times EF_2$	<b>47</b>
<b>Ecuación 40</b>	$N_{PASTOREO} = F_{PRP} \times EF_3$	<b>47</b>

## Abreviaturas

<b>AGV:</b> Ácidos Grasos Volátiles	<b>msnm :</b> Metros sobre el nivel del mar
<b>D:</b> Dieta	<b>NEI<sub>d</sub> :</b> Requerimientos de EN para desplazamiento
<b>De:</b> Digestibilidad enzimática de la materia orgánica	<b>NEI<sub>g</sub> :</b> Requerimientos de EN para gestación
<b>DE:</b> Digestibilidad de Energía	<b>NEI<sub>l</sub> :</b> Requerimientos de EN para lactación
<b>DMO:</b> Digestibilidad de la materia orgánica	<b>NEI<sub>m</sub> :</b> Requerimientos de EN para mantenimiento
<b>E:</b> Estación	<b>NEI<sub>p</sub> :</b> Requerimientos de EN para actividad de pastoreo
<b>EB:</b> Energía Bruta	<b>NEI<sub>pv</sub> :</b> Requerimientos de EN para cambio de peso vivo
<b>ED:</b> Energía Digestible	<b>NIR:</b> Espectrometría en el infrarrojo cercano
<b>EE:</b> Extracto Etéreo	<b>PTN:</b> Peso de ternero al nacimiento
<b>ELN:</b> Extracto Libre de Nitrógeno	<b>PV:</b> Peso Vivo
<b>EM:</b> Energía Metabolizable	<b>rsd:</b> Desviación estándar residual
<b>EN:</b> Energía Neta	<b>TMR:</b> Ración Completa Mezclada (Total Mixed Ration)
<b>ENAC:</b> Entidad Nacional de Acreditación	<b>UF:</b> Unidades Fertilizantes
<b>FAD:</b> Fibra Acido Detergente	
<b>FB :</b> Fibra Bruta	
<b>FND:</b> Fibra Neutro Detergente	
<b>F<sub>OS</sub> :</b> Superficie dedicada al cultivo	
<b>F<sub>PRP</sub> :</b> N del estiércol de pastoreo	
<b>F<sub>SN</sub> :</b> N producido a partir del uso de fertilizantes químicos	
<b>GEI:</b> Gases de Efecto Invernadero	
<b>MOD:</b> Materia orgánica digestible	
<b>MSI:</b> Materia Seca Ingerida	

## Resumen

El sector lechero contribuye a las emisiones totales de GEI, siendo las principales fuentes las pérdidas de carbono (C) generadas por el uso del suelo, las emisiones de metano procedentes de la fermentación entérica y el óxido nitroso (N<sub>2</sub>O) que proviene de la gestión del suelo y el estiércol. Por esta razón, es necesario evaluar estas emisiones con el fin de mitigar las emisiones de GEI tanto directas por el ganado lechero como por el cultivo de forrajes sin afectar a la producción de forrajes ni a la producción de leche.

El presente trabajo se realizó con el objetivo de estimar las emisiones de metano originado de la fermentación entérica y del estiércol y las emisiones de óxido de nitroso generadas por la gestión del suelo y del estiércol, aplicando el modelo empírico del IPCC (2006) en vacas Holstein en pastoreo alimentadas con raciones basadas en ensilado de raigrás italiano o con ensilado del inter-cultivo de haba y colza forrajera en dos periodos de pastoreo: primavera y otoño. Además, se pretende comparar este modelo con otros modelos propuestos por Yates *et al.* (2000), Mills *et al.* (2003) y Ellis *et al.* (2007).

Los resultados obtenidos muestran que las diferencias en el consumo registradas entre dietas experimentales y/o estaciones se reflejan en la estimación de metano entérico. Así el consumo de la ración completa mezclada (TMR) difirió entre el otoño y la primavera, y entre los dos tipos de dieta ofertada a los animales, por lo que la estimación de metano entérico también varió entre estaciones y dietas al considerar la ingesta de TMR exclusivamente. Asimismo la diferencia en el consumo de pienso entre estaciones se refleja también en las emisiones de metano entérico a partir del pienso. Cuando se consideró la ingesta total de materia seca no se observó ninguna diferencia en la emisión de metano entérico entre temporadas y dietas.

Cuando las predicciones del IPCC (2006) se comparan con otros modelos propuestos, los resultados estimados de la producción de metano entérico, fueron más altos con el modelo de Yates *et al.* (2000) y más bajas con los modelos de Ellis *et al.* (2007). Las ecuaciones propuestas por Mills *et al.* (2003) obtuvieron resultados con una alta correlación con los obtenidos con el modelo del IPCC e incluso coincidentes cuando se aplicó la ecuación lineal basada en la EM de la ración.

## Summary

The dairy sector contributes to total greenhouse gases emissions (GHG) whose main sources are the carbon losses (C) generated by land use, emissions of methane from enteric fermentation and nitrous oxide (N<sub>2</sub>O) from land and manure management. For this reason it is necessary to evaluate these emissions to reduce direct GHG emissions produced by both dairy farming as forage without affecting either forage production or milk production.

The objective of this work is to estimate methane emissions from enteric fermentation and manure and as well as the nitrous oxide emissions from soil management and manure, applying the empirical model of the IPCC (2006) for Holstein cows in pasture feeding rations based on Italian ryegrass silage or faba bean-rapeseed intercrop silage for two grazing periods: spring and autumn. In addition, it is planned to compare this model with other models proposed by Yates *et al.* (2000), Mills *et al.* (2003) Ellis *et al.* (2007).

The results obtained show that the intake's differences observed between the experimental diets and / or between the seasons are also reflected in the estimation of enteric methane emissions. Thus, the TMR intake was different from autumn to spring, as well as between the two types of diet offered to the animals, which led to the variation of the enteric methane emissions between seasons and diets. In the same way, the difference of the concentrate intakes between seasons can also be seen in enteric methane emissions predictions. Considering the total intake of dry matter, methane emissions showed no difference either between seasons or between diets.

Compared with the IPCC (2006) model, the equation used by Yates *et al.* (2000) presented higher methane emission estimation while the models proposed by Ellis *et al.* (2007) gave lower prediction values. The equations suggested by Mills *et al.* (2003) provided results with a high correlation with those obtained using the IPCC model and even suitable when the linear equation expressed with metabolizable energy was applied.

## Résumé

Le secteur laitier contribue aux émissions totales de gaz à effet de serre (GES) dont les principales sources sont les pertes de carbone (C) générés par l'utilisation des terres, les émissions de méthane issues de la fermentation entérique et l'oxyde nitreux (N<sub>2</sub>O) provenant de la gestion des terres et du fumier. Pour cette raison, il est nécessaire d'évaluer ces émissions afin d'atténuer les émissions directes de GES produites aussi bien par l'élevage laitier que par les cultures fourragères sans affecter ni la production fourragère ni la production laitière.

L'objectif de ce travail est d'estimer les émissions de méthane provenant de la fermentation entérique et du fumier ainsi que les émissions d'oxyde nitreux générées par la gestion du sol et du fumier, en appliquant le modèle empirique de l'IPCC (2006) pour des vaches de race Holstein en pâturage alimentées avec des rations à base d'ensilage de ray-grass italien ou d'ensilage d'inter-cultures de fève et de colza fourragère pendant deux périodes de pâturage : printemps et en automne. En outre, il est prévu de comparer ce modèle avec d'autres modèles proposés par Yates *et al.* (2000), Mills *et al.* (2003) et Ellis *et al.* (2007).

Les résultats obtenus montrent que les différences d'ingestion observées entre les diètes expérimentales et / ou entre les saisons se reflètent au niveau de l'estimation des émissions du méthane entérique. Ainsi, la consommation de la TMR a été différente entre automne et printemps, ainsi qu'entre les deux types de régime alimentaire offerts aux animaux, ce qui fait que l'estimation du méthane entérique a également varié entre saisons et régimes alimentaires. De la même manière la différence de l'ingestion de concentrés entre saisons est également reflétée au niveau des émissions de méthane entérique. Considérant l'apport total de matière sèche, les émissions de méthane n'ont présenté aucune différence ni entre saisons ni entre régimes alimentaires.

Comparé avec le modèle de l'IPCC (2006), l'équation utilisée par Yates *et al.* (2000) a présenté une estimation d'émission de méthane plus élevée alors que les modèles d'Ellis *et al.* (2007) ont donné des prédictions de valeurs plus faibles. Les équations proposées par Mills *et al.* (2003) ont fourni des résultats présentant une corrélation élevée avec

ceux obtenus, utilisant le modèle de l'IPCC et voire même adaptés quand l'équation linéaire exprimée en énergie métabolisable de la ration a été appliquée.



# **INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS**



## **I. Introducción y objetivos**

El calentamiento del clima es inequívoco. Desde los años 50, la mayoría de los cambios observados no tienen precedentes desde hace décadas, incluso milenios. La atmósfera y el océano se han calentado, la cantidad de hielo polar y glacial han disminuido, y el nivel del mar ha subido (Bindoff *et al.*, 2007). Las emisiones de gases de efecto invernadero (GEI) de origen antropogénico han crecido desde la época pre-industrial como resultado del crecimiento económico y demográfico en gran medida. Por ejemplo los sectores de industria, de producción de calor y del uso de electricidad contribuyeron con el 45% de las emisiones globales de GEI en 2010. El sector de la agricultura también juega un papel importante en estas emisiones ya que participa con el 14% del total de emisiones mundiales (Climate change, 2014). El sector lechero, como producción ganadera, es una fuente de producción de GEI, ya que contribuye con el 3% del total de las emisiones antropogénicas. Además, la industria de fabricación de piensos representa aproximadamente el 10% de las emisiones y el almacenamiento del estiércol puede alcanzar hasta el 9% (Gerber *et al.*, 2010).

Los rumiantes poseen un sistema digestivo con la capacidad de aprovechar los carbohidratos estructurales y producir alimentos de alta calidad nutritiva: leche y carne. Sin embargo, este mismo sistema digestivo también produce metano, un potente gas de efecto invernadero que contribuye con aproximadamente el 18% del calentamiento global ocasionado directamente por la ganadería (Chandramoni *et al.*, 2000). Por esto se considera que la producción animal debe orientarse hacia una menor producción de metano. Johnson y Johnson (1995) señalan que, el metano entérico actúa directamente sobre el cambio climático a través de su interacción con la energía infrarroja e, indirectamente, a través de las reacciones de oxidación atmosféricas que producen CO<sub>2</sub>.

Se han propuesto diferentes estrategias para mitigar las emisiones de metano que van desde reducir el número de rumiantes hasta manipular genéticamente los microorganismos ruminales metanogénicos. Aunque la única estrategia viable y con potencial es la manipulación de la dieta de los rumiantes. La manipulación nutricional para mitigar la metanogénesis incluye uso de forrajes de alta calidad, alta proporción de cereales en la dieta, dietas ricas en ácidos grasos insaturados, uso de aditivos: ácidos orgánicos, ionóforos, probióticos o aceites esenciales, así como bacteriocinas o virus

que actúen contra la microbiota metanogénica. La mejora de las características nutricionales del forraje y la implementación de las estrategias de alimentación pueden mejorar las características fermentativas a nivel ruminal, reflejándose en mayor productividad y generalmente en una disminución en las emisiones de metano. Además, la disminución de metano entérico puede ser una estrategia para el aumento de la productividad del animal, porque constituye una pérdida energética para el rumiante de entre el 2 y 12% de energía bruta ingerida (Johnson y Johnson, 1995).

Por otra parte la aplicación de fertilizantes sintéticos a los suelos agrícolas supone otro contribuyente de las emisiones, siendo además, la fuente de más rápido crecimiento en la agricultura, con un incremento en sus emisiones del 37 por ciento desde 2001 (Gerber *et al.*, 2010). Los fertilizantes son el origen de la producción especialmente del dióxido de carbono y el óxido de nitroso. Por lo tanto, la producción agroganadera contribuye a las emisiones antropogénicas de metano, dióxido de carbono y óxido de nitroso a la atmósfera y es importante cuantificarlas, con el fin de establecer posteriores estrategias de mitigación.

La determinación directa de los GEI es compleja y requiere equipamientos muy costosos (Fernández *et al.*, 2012). Ahora bien, para estimar las emisiones de GEI en vacuno lechero se han desarrollado varios modelos empíricos simples o complejos modelos mecanísticos. Éstos últimos permiten predecir las emisiones de metano y de óxido nitroso en base al tipo de alimento y a la cantidad de materia seca ingerida (Kebreab *et al.*, 2006), porque la dieta y el propio factor animal juegan un importante papel en estos modelos de predicción (Yan *et al.*, 2002). Algunos de los modelos propuestos en la literatura se basan exclusivamente en la ingestión de materia seca (sin considerar la composición de la dieta) o de carbohidratos digestibles o en la ingestión de energía digestible, o de energía metabolizable. Otros modelos proponen utilizar un mayor número de factores dietéticos y animales, incluyendo la proporción de forraje de la ración. Los datos utilizados para el desarrollo de estas ecuaciones se basan principalmente en las observaciones individuales de los animales, lo que incrementa la variación total y pueden impedir la detección de la significación estadística de algunos factores dietéticos importantes.

El grupo Intergubernamental de expertos sobre el cambio climático (IPCC) ha establecido a través de diferentes grupos de trabajo, modelos de cálculo de emisiones, sugiriendo diferentes factores de emisión según el nivel de conocimiento y datos concretos de cada zona geográfica y producción agroganadera. Aunque sus estimaciones pueden considerarse inexactas, constituye el único modelo consensuado a nivel global porque permite realizar aproximaciones de las emisiones que pueden ser utilizadas con fines comparativas entre sistemas productivos.

Considerando todo lo anterior se ha planteado el presente trabajo cuyo principal objetivo ha sido estimar las emisiones de gases de efecto invernadero basándose en el modelo propuesto por el IPCC (2006) en vacas Holstein en pastoreo alimentadas con raciones basadas en ensilado de raigrás italiano o con ensilado del inter-cultivo de haba y colza forrajera.

Como segundo objetivo, se pretende estimar las emisiones de GEI aplicando otros modelos contrastados (Yates *et al.*, 2000; Mills *et al.*, 2003 y Ellis *et al.*, 2007) comparado sus estimaciones con los resultados por el IPCC (2006).



# **REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**



## II. Revisión bibliográfica

El clima de la tierra varía según las épocas y las zonas. Los cambios observados se extienden generalmente por largos períodos de tiempo; sin embargo, en las últimas décadas, estos cambios parecen haberse acelerado, basándose en algunos indicadores del cambio climático, como el aumento de la temperatura de la superficie de la Tierra, la reducción de la superficie del hielo Ártico y de los glaciares continentales, el aumento del nivel medio global del mar que se mide por satélite desde 1992 y que es del orden de 3,4 mm / año, y los indicadores biológicos, que se traducen en el desplazamiento de las poblaciones de animales terrestres y marinos, así como en el desplazamiento de las fechas de las actividades agrícolas. El fenómeno considerado más importante en este cambio climático es **el efecto invernadero** (Salençon y Carpentier, 2010). Es un fenómeno natural que resulta de la presencia en la atmósfera de gases que absorben la radiación infrarroja térmica emitida por la superficie de la Tierra, y sin la cual la temperatura media global sería alrededor de -18° C en lugar de +15° C (Seguin y Soussana, 2008). Ahora bien, el efecto invernadero se está acentuando por el incremento de determinados gases como el CO<sub>2</sub> y CH<sub>4</sub> debidos a la actividad humana (IPCC, 2007).

### II.1. Principales gases de efecto invernadero

Los gases de efecto invernadero (GEI) son aquellos implicados en dicho fenómeno. Los principales son **el vapor de agua, el ozono, el dióxido de carbono, el óxido de nitroso y el metano**. Estos gases están presentes en la atmósfera de manera natural, aunque su concentración puede verse modificada por la actividad humana. Asimismo, otros gases originados directamente de las actividades humanas como los clorofluorocarbonos, entre otros, contribuyen también al efecto invernadero. En esta revisión nos centramos exclusivamente en los gases de efecto invernadero naturales y especialmente en los que se ha producido un incremento en concentración debido a las actividades humanas y ganaderas.

### II. 1.1. Vapor de agua (H<sub>2</sub>O)

Es considerado el principal gas de efecto invernadero responsable de los dos tercios del efecto invernadero natural. En la atmósfera, las moléculas de agua captan el calor que la Tierra refleja y lo vuelven a emitir en todas las direcciones, calentando la superficie de la Tierra. Su cantidad en la atmósfera depende poco de la influencia directa de las actividades humanas.

### II. 1.2. Ozono (O<sub>3</sub>)

Compuesto de tres átomos de oxígeno, el ozono (O<sub>3</sub>) es un gas raro, el 90% de sus moléculas se encuentran en la atmósfera entre 12 y 50 km de altitud (estratosfera), y el resto se encuentra esencialmente como contaminante cercano a las ciudades. El ozono estratosférico forma una capa fundamental: **la capa de ozono**, que limita el paso y absorbe los rayos solares más peligrosos, especialmente UVB y UVC y permite el desarrollo de la vida en la Tierra. El ozono que se encuentra en la troposfera entre 8 y 16 km de altitud, tiene como origen las actividades humanas y resulta de la transformación química del oxígeno en contacto con los óxidos de nitrógeno y compuestos orgánicos volátiles y en presencia de la radiación ultravioleta solar y temperatura elevada. El ozono es un gas de efecto invernadero natural que contribuye al equilibrio climático de la misma manera que el CO<sub>2</sub>.

### II. 1.3. Dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>)

Desempeña un importante papel en el ciclo del carbono en la naturaleza y enormes cantidades de este gas, del orden de 10<sup>12</sup> toneladas, pasan por el ciclo natural del carbono, en el proceso de fotosíntesis. El dióxido de carbono tiene un poder de captación de la radiación elevado que puede alcanzar hasta el 49% (Watson *et al.*, 1990). Es el gas que tiene una vida en la atmósfera la más larga, entre 50 y 200 años, y es la primera fuente de carbono.

El incremento de su concentración es debido al aumento del uso de combustibles fósiles en la industria, el transporte y el hábitat lo que está incrementando el calentamiento global. La cantidad de CO<sub>2</sub> emitida en la atmósfera alcanzó el 57% del total de GEI en 2004. Es

necesario señalar que la tala de bosques y la descomposición natural de los materiales vegetales liberan también el dióxido de carbono cuyo porcentaje alcanzó en 2004, el 17% (Vandaele *et al.*, 2010) del total de GEI.

Las fuentes de emisión de CO<sub>2</sub> en la producción lechera son la quema de combustible fósil, el uso de fertilizantes, herbicidas, insecticidas, la producción de forrajes (laboreo, cosecha, recolección), el uso de maquinaria, etc. (Hagemann *et al.*, 2012).

#### **II. 1.4. El metano (CH<sub>4</sub>)**

El metano es el segundo gas más importante de efecto invernadero previéndose que en el futuro pueda ser el principal (McCaughey *et al.*, 1999). Es el resultado de la fermentación de la materia orgánica vegetal y animal mediante arqueobacterias metanogénicas en ambientes anaeróbicos. Su tiempo de vida química desde la eliminación a través de reacciones con el radical hidroxilo (OH) se estima en 9,6 años (Folland *et al.*, 2001). Sin embargo, el CH<sub>4</sub> realmente permanece en la atmósfera, en lo que se conoce como "tiempo de vida de perturbación", de aproximadamente 12 años antes de su eliminación y su conversión final a dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), principalmente por la oxidación química en la atmósfera inferior o troposfera. Durante un período de 100 años, cada molécula de CH<sub>4</sub> tiene 25 veces el potencial de calentamiento global directo de una molécula de CO<sub>2</sub> (Solomon *et al.*, 2007).

La mayor parte del metano emitido a la atmósfera proviene de actividades humanas como la distribución de gas natural y del enterramiento de los residuos. El campo de la agricultura también juega un papel importante en la emisión de metano, como por ejemplo el cultivo de arroz, la producción de rumiantes y las deyecciones de los animales (Chynoweth, 1996). En la tabla II.1 se resume la magnitud de las emisiones antropogénicas de metano.

Tabla II.1. Fuentes antropogénicas de metano atmosférico (Tg o 10<sup>6</sup> toneladas/año)

Fuentes de emisión	Estimación	Rango
Minas de carbón, gas natural, industrias petroleras	100	70-120
Cultivo de arroz	60	20-150
Ganado	80	65-100
Deyecciones de animales	25	10-20
Depuración de aguas residuales	25	20-25
Rellenos de tierra	30	20-70
Combustión de biomasa	40	20-80
Total	360	400-610

Chynoweth, (1996)

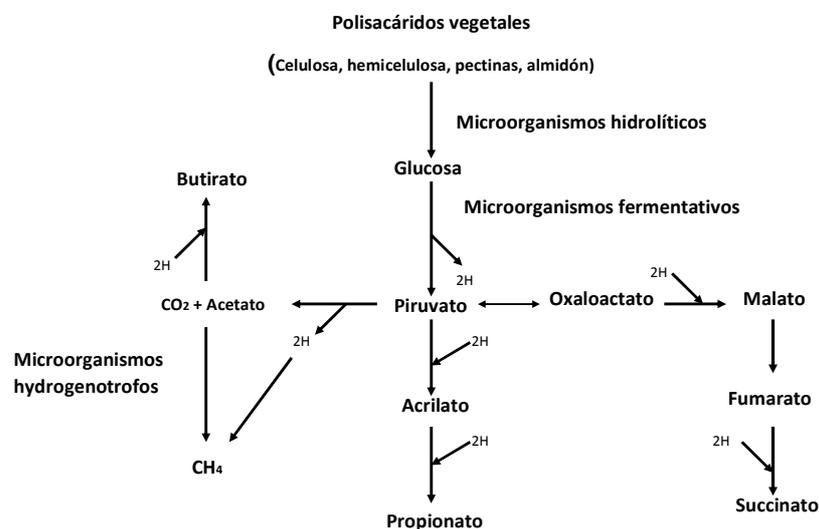
Johnson y Johnson (1995) estimaron en 85 millones de toneladas/año las emisiones de metano por el ganado vacuno, lo que representa el 73% del total de emisiones de metano de todas las especies domésticas, siendo responsables de aproximadamente el 15-20% de la emisiones antropogénicas globales (Moss *et al.*, 2000). Se considera que en los sistemas de alta producción, la emisión de metano es de 60 a 126 kg por animal y año (Johnson y Johnson, 1995). Mientras que DeRamus *et al.* (2003) estimaron que las emisiones anuales de metano por vacas adultas en pastoreo están entre 60 y 95 kg/año.

#### II. 1.4.1. La producción de metano en la fisiología digestiva de los rumiantes

El aparato digestivo de los rumiantes tiene la característica de tener un estómago compuesto de cuatro compartimentos: retículo, rumen, omaso y abomaso. El rumen hace las funciones de cámara de fermentación anaeróbica y debe tener las condiciones adecuadas para el desarrollo de microorganismos (bacterias, protozoos y hongos) que aseguran la fermentación de los alimentos ingeridos mediante la secreción de enzimas específicas para cada sustrato (almidón, celulosa, hemicelulosa...).

La producción de CH<sub>4</sub> por la microbiota ruminal es parte de su metabolismo energético. Utilizan el CO<sub>2</sub> como su aceptor terminal de electrones en su respiración anaeróbica, convirtiéndolo a CH<sub>4</sub>. El donador de electrones utilizado en este proceso es generalmente el H<sub>2</sub>. Los microorganismos del rumen metabolizan los carbohidratos de la dieta transformándolos a ácidos grasos volátiles: acetato, propionato y butirato cuyas proporciones varían con la naturaleza de los hidratos de carbono ingeridos (Chenost y

Kayouli, 1997). En la síntesis de acetato y butirato se producen moléculas de hidrógeno que deben ser eliminadas para mantener la eficiencia energética durante los procesos de fermentación anaerobia (Beauchemin *et al.*, 2008). En la figura II.1. se muestra un esquema de la producción de metano a partir de la fermentación de los carbohidratos de la dieta. El acetato y el butirato promueven la producción de metano, mientras que las fermentaciones propiónicas pueden ser consideradas como una forma de mitigación de las emisiones de metano entérico. La relación acético: propiónico puede variar entre 0,9 y 4,0 por lo tanto las pérdidas por metano varían ampliamente. Cuando se reduce la relación acetato: propionato se inhibe la metanogénesis debido a la toxicidad de los ácidos de la fermentación hacia la microbiota en su síntesis. Las principales vías de eliminación de hidrógeno son a través de la biohidrogenación de ácidos grasos insaturados, la formación de ácido propiónico y de metano (Van Soest, 1994). En esta última vía se reducen el CO<sub>2</sub> generado a CH<sub>4</sub> que no puede ser aprovechado por el animal siendo eliminado a través del eructo y en menor medida a través de la respiración o de flatulencias (Cambra-López *et al.*, 2008). El 87% de la producción de metano se da en la fermentación ruminal y 13% restante en los procesos fermentativos del intestino grueso y ciego (McCaughey *et al.*, 1999)



Martin, 2006

Figura II.1. Proceso de producción del metano a partir de la fermentación de carbohidratos de la dieta.

El grupo microbiano responsable de la metanogénesis son la arqueobacterias, microorganismos del dominio *Archea* (Van Soest, 1994), grupo de microorganismos unicelulares procariota que incluye dos reinos: *Euryarchaeota* y *Crenarchaeota* (Jarrell *et al*, 1999). Las principales especies de arqueobacterias son *Methanobrevibacter ruminantium*, *Methanobrevibacter arboriphilus*, *Methanobrevibacter smithii*, *Methanobacterium formicicum*, *Methanobacterium bryantii*, *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *Methanococcus vannielli*, *Methanococcus voltae*, *Methanomicrobium mobile*, *Methanogenium cariaci*, *Methanogenium marisnigri*, *Methanospirillum hungatei*, *Methanosarcina barkeri* (Klass, 1984). La vía principal de la producción de metano por parte de las arqueobacterias es la reducción del CO<sub>2</sub> usando el H<sub>2</sub> por las arqueobacterias, lo que estimula el crecimiento de bacterias ruminales productoras de H<sub>2</sub> como *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens* y *Selenomonas ruminantium*. Asimismo, en animales alimentados con altas proporciones de concentrado, se ha observado un papel importante en la metanogénesis por parte de los protozoos ruminales, ya que las arqueobacterias se adhieren a estos permitiendo una transferencia interespecífica de H<sub>2</sub> (Johnson y Johnson, 1995).

Las arqueobacterias son pH dependientes, así, cuando se incuban en un medio a pH 7 reducen el CO<sub>2</sub> y el H<sub>2</sub> a CH<sub>4</sub>, pero la síntesis de metano se reduce cuando el pH baja a 6,5 y se anula a pH 6 (Van Kessel y Russel, 1996). Dietas con forrajes de baja calidad no causan una disminución en el pH ruminal, por lo que están asociados a una alta producción de metano. Mientras que dietas con altos contenidos de alimentos concentrados que induzcan a una reducción del pH en el rumen disminuyen la producción de metano.

#### **II. 1.4.2. Factores de variación de la producción de metano**

La producción de metano por los rumiantes, se ve afectada por diferentes factores intrínsecos del animal o relacionados con la dieta.

### II. 1.4.2.1. Factores animales (Especie, tamaño y nivel de producción)

El factor especie desempeña un papel importante en la formación de metano, ya que el perfil microbiano del rumen difiere de un animal a otro en términos de composición y actividad metabólica (Blas *et al.*, 2008). Del mismo modo, el tamaño y la ubicación de la zona de fermentación afectan el tiempo de residencia de los alimentos en el rumen, y los alimentos que son fermentados rápidamente favorecen la disminución de la producción de metano en beneficio del propionato (Demeyer y Fievez, 2000). En la tabla II.2 se muestra los niveles de emisión de metano por parte de las principales especies de rumiantes en España. En ella se puede observar que el ganado bovino es el mayor emisor de metano.

Tabla II.2. Emisión de CH<sub>4</sub> por diferentes especies en España en 2012.

	Nº de cabezas	Tonelada CH <sub>4</sub> / año
Vacuno de leche	834.596	85.747
Otro ganado vacuno	5.076.962	212.170
Ganado ovino	16.339.374	141.173
Ganado caprino	2.637.336	13.187

Fuente: Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (2012)

De acuerdo con un análisis realizado por Machmüller y Clark (2006) en Nueva Zelanda sobre producción de metano en rumiantes en pastoreo (bovino y ovino), las emisiones de CH<sub>4</sub> están directamente relacionadas con el peso del animal según la siguiente ecuación:

$$\text{CH}_4 \text{ (l / d)} = 3,58 \times \text{PV}^{0,75}, \text{ R}^2 = 0,83$$

En un estudio realizado en 1995 por Vermorel en vacas lecheras francesas con un peso medio de 600 kg y con una dieta basada en raciones de ensilado de maíz al 70%, la emisión de CH<sub>4</sub> era directamente proporcional al nivel de producción:

$$\text{CH}_4 \text{ (l / d)} = 6,86 \text{ (kg/d)} \times \text{Producción de leche (l/d)} + 317, \text{ R}^2 = 0,59$$

En la tabla II.3 se observa que la cantidad de metano emitida aumenta con el nivel de producción de leche. Así, los animales de baja producción tienen alrededor de 15% menos de emisiones totales de CH<sub>4</sub> que los animales de alta producción. Ahora bien, si la emisión de metano se expresa en función de la producción lechera se observa que hay una disminución de las emisiones con las producciones más altas.

Tabla II.3 Variación de las emisiones de metano en vacas lecheras según el nivel de producción.

Producción de leche (kg/año)	m <sup>3</sup> /año	Emisiones de metano	
		L/d	L/kg leche
6500	161	442	24,8
5500	154	423	28,1
4500	147	404	32,8
3400	140	382	41,1

Vermorel (1995)

#### II. 1.4.2.2. Influencia de la dieta sobre la producción de CH<sub>4</sub>

El nivel, la frecuencia de consumo y las características físicas y químicas del alimento son factores relacionados con la cantidad de CH<sub>4</sub> emitido, tras la fermentación entérica. De manera general, cuando aumenta la materia seca ingerida, el porcentaje de energía bruta que se pierde como metano se reduce. La ingestión de materia seca está correlacionada positivamente con la producción de CH<sub>4</sub> (Boadi *et al.*, 2002). Sin embargo, esto depende del tipo de alimento, ya que cuando se ofrecen cantidades limitadas de carbohidratos altamente digestibles, ocurre proporcionalmente una elevada pérdida de CH<sub>4</sub> y al contrario, cuando se ofrecen grandes cantidades de carbohidratos altamente digestibles hay una menor pérdida de CH<sub>4</sub> (Johnson y Johnson, 1995).

El principal factor dietético para la producción de metano es el tipo de carbohidrato y su tasa de fermentación (Chandramoni *et al.*, 2000) por su impacto en el pH y la población microbiana. Así, por ejemplo los concentrados ricos en almidón (cebada, trigo, maíz) tienen un efecto depresivo sobre la metanogénesis mayor que con los concentrados ricos en paredes digestibles como la pulpa de remolacha. Martin *et al.* (2006) citan un estudio

dónde muestran que en las vacas lecheras, la sustitución de la pulpa de remolacha (70% de la ración) por la cebada resultó en una reducción del 34% de las pérdidas de energía en forma de metano. Ello es debido a que la fermentación de los carbohidratos estructurales produce una alta relación de acetato: propionato y, por lo tanto, una alta producción de metano, mientras que las dietas ricas en almidón favorecen la producción de propionato, disminuyendo la metanogénesis. Por otro lado un estudio realizado por Chagunda *et al.* (2010) muestra que la calidad de ensilado de hierba ingerida por las vacas lecheras afecta a la producción de metano estimada según ecuaciones sugeridas por Yates *et al.* (2000) y Mills *et al.* (2003). (Tabla II.4)

Tabla II.4. Producción de leche (kg / d) y estimaciones de la producción de metano entérico (g / kg de leche) de cada categoría de ensilado.

Variable	Calidad de Ensilado					
	Baja		Media		Alta	
	Promedio	e.e.	Promedio	e.e.	Promedio	e.e.
Producción de leche (kg/d)	14,3	0,22	17,3	0,15	22,2	0,19
Metano 1 (g/kg leche)	28,1	0,45	23,6	0,30	18,7	0,39
Metano 2 (g/kg leche)	29,3	1,25	24,6	0,83	20,5	1,07

Metano 1= Yates *et al.* (2000), Metano 2 = Mills *et al.* (2003).

Chagunda *et al.* (2010)

Basándose en la ecuación de Yates *et al.* (2000) el forraje de baja calidad tuvo 16 y 33% de metano entérico por kg de leche más que de los forrajes de media y alta calidad, respectivamente. Estas diferencias pueden ser debidas a la distinta degradabilidad de los ensilados. Así, las dietas con alta degradabilidad ruminal presentan menores producciones de metano (Johnson y Johnson, 1995) debido al incremento en el tránsito del alimento por el retículo-rumen. Cuando la tasa de paso se incrementó de un 54 a un 68%, la producción de metano se redujo en un 30% aproximadamente (Moss *et al.*, 2000). Por ello, el picado o peletizado de los forrajes pueden disminuir la producción de metano de modo importante. Los resultados obtenidos de este estudio con el consumo de concentrado, también demostraron que la producción de metano por kg de leche disminuyó cada vez que aumentaron la cantidad de concentrados en la ración.

La alimentación con dietas ricas en ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga disminuye la metanogénesis porque la hidrogenación de los ácidos grasos insaturados se convierte en una vía alternativa en la utilización del H<sub>2</sub> (Johnson y Johnson, 1995). Ahora bien, la proporción de H<sub>2</sub> usado en los procesos de biohidrogenación es muy inferior al usado en la reducción del CO<sub>2</sub> o la síntesis de AGV (Dohme *et al.*, 2000), si bien la ecotoxicidad de los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga sobre las arqueobacterias también tiene su efecto en la reducción de la metanogénesis con dietas ricas en este tipo de ácidos grasos (Dohme *et al.*, 2000; Moss *et al.*, 2000). Los forrajes jóvenes contienen mayores proporciones de ácidos grasos insaturados que los maduros (Sun *et al.*, 2012) por lo que forrajes más jóvenes tendrían mayor potencial de reducción de metano que los forrajes más maduros. Así mismo, estos últimos tienen una mayor concentración de carbohidratos estructurales que ha sido relacionada con una mayor producción de metano. A su vez, la mayor concentración en carbohidratos estructurales disminuiría su degradabilidad, por lo que disminuiría la concentración de AGV en el rumen y aumentaría el pH ruminal, favoreciendo el crecimiento de la población de arqueobacterias.

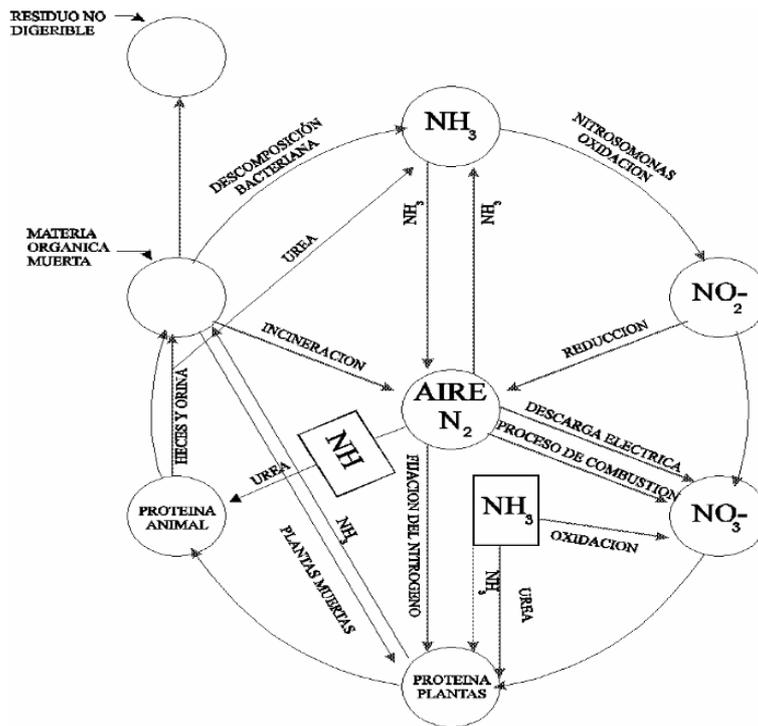
La reducción del nivel proteico de la ración disminuye las emisiones de metano porque su degradación compite con la metanogénesis por parte de las arqueobacterias (Anderson y Rasmussen, 1998). Ahora bien, existe un efecto positivo de la inclusión de leguminosas forrajeras en la ración, que reducen el nivel de metanogénesis hasta un 53% (De Klein *et al.*, 2008). Esto podría ser consecuencia de un menor contenido de fibra en las dietas con leguminosas, una reducción en el pH, un aumento en la concentración de NH<sub>3</sub> y AGV, con menor relación acético: propiónico en el rumen, mayor tasa de paso o la presencia de algunos metabolitos secundarios (Williams *et al.*, 2005; Waghorn, 2008; Beauchemin *et al.*, 2008; Eckard *et al.*, 2010). Navarro-Villa *et al.* (2011) observaron, en estudios *in vitro*, una disminución del 7% en la producción de metano con el trébol respecto al raigrás inglés. La sustitución en la dieta del bromo por una mezcla de bromo y alfalfa reducen las emisiones de metano entre un 20% (Chaves *et al.*, 2006) y un 25% (McCaughey *et al.*, 1999). Esta menor producción de metano ha sido achacada a una mayor tasa de paso por el retículo-rumen y al elevado contenido en malato de las hojas de la alfalfa (Martin *et al.*, 2009). El malato es un intermediario en la vía de producción de propionato y, al disminuir la relación acetato: propionato en el rumen, disminuye la producción de metano entérico.

Otra parte de las emisiones de metano proviene de la fermentación de las deyecciones animales como el estiércol y el purín. Según su gestión y su cantidad, los desechos animales serán entonces una fuente de CH<sub>4</sub>, N<sub>2</sub>O y / o CO<sub>2</sub>. Los excrementos, ricos en materia orgánica, fermentan cuando están acumulados bajo condiciones anaeróbicas ya que las bacterias convierten el CO<sub>2</sub> en metano. Es por eso que las emisiones de metano son importantes durante los meses en que los animales están en estabulación. Cuando el estiércol se almacena o se procesa como líquido se descompone anaeróbicamente y puede producir una cantidad significativa de CH<sub>4</sub>. La temperatura y el tiempo de retención de la unidad de almacenamiento son dos factores que inciden significativamente en la cantidad de metano producida. Cuando el estiércol se maneja como sólido o cuando se lo deposita en pastos y prados, tiende a descomponerse bajo condiciones más aeróbicas y se produce menos CH<sub>4</sub> (IPCC, 2006).

## **II. 1.5. Óxido de nitroso (N<sub>2</sub>O)**

El óxido de nitroso es un gas de efecto invernadero de larga vida responsable de un fuerte aumento del forzamiento radiativo del sistema climático. El N<sub>2</sub>O tiene una vida atmosférica de unos 114 años, y durante un período de 100 años, cada molécula de N<sub>2</sub>O tiene un calentamiento global directo potencial 298 veces mayor que de una sola molécula de CO<sub>2</sub> (Solomon *et al.*, 2007).

La producción mundial de N<sub>2</sub>O se atribuye en gran parte a los procesos microbianos. Las bacterias producen N<sub>2</sub>O mediante nitrificación y desnitrificación, que son los principales procesos en el ciclo natural del nitrógeno (Figura II.2). La nitrificación es la principal fuente de N<sub>2</sub>O en condiciones aeróbicas, mientras que la desnitrificación domina en condiciones anaeróbicas.



Sawyer y McCarty (1978)

Figura II.2. El ciclo del Nitrógeno

La fuente microbiana de N<sub>2</sub>O antropogénico es debida en gran parte al uso de suelos agrícolas para la producción de forraje y cultivos fijadores de nitrógeno. También se debe a la utilización del estiércol y fertilizantes químicos, la de combustibles fósiles, el tratamiento de aguas residuales y la incineración de residuos. Sin embargo cabe mencionar que existe un origen natural para la producción del óxido de nitroso y que se produce en los medios acuáticos (mares, océanos, acuarios, y humedales) (U.S. EPA, 2007). El flujo total de N<sub>2</sub>O en la atmósfera se estima en 18 Tg N / año, lo que muestra un incremento desde la época pre-industrial (Solomon *et al.*, 2007). Este aumento se debe a las actividades humanas, sobre todo en el campo de la agricultura.

Las emisiones de N<sub>2</sub>O se producen por vía directa (es decir, directamente de los suelos a los que se agrega o libera el N) y a través de dos vías indirectas: (i) a partir de la volatilización de NH<sub>3</sub> y NO<sub>x</sub> de suelos, y (ii) después de la lixiviación y el escurrimiento del N, principalmente como NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, de suelos agrícolas (IPCC, 2006).

### **II. 1.5.1. Emisiones directas de N<sub>2</sub>O**

Las emisiones de N<sub>2</sub>O por los suelos agrícolas son en mayor parte de origen biogénico y resultan de los procesos de nitrificación, que consiste en la oxidación microbiana aerobia del ion amonio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) a ion nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), y la desnitrificación, que es la reducción microbiana anaerobia del ion nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) a nitrógeno molecular N<sub>2</sub>, generándose en ambos procesos emisiones de óxido nitroso N<sub>2</sub>O como gas intermedio.

En la mayoría de los casos, las emisiones de N<sub>2</sub>O se incrementan con relación al aporte de nitrógeno a los suelos. Este aporte puede ser inducido por el hombre o por cambios en el uso de la tierra y/o en las prácticas de gestión que mineralicen el N orgánico del suelo. Las fuentes de N para estimar las emisiones directas de N<sub>2</sub>O de suelos agrícolas son:

- Fertilizantes de N sintéticos.
- Fertilizantes orgánicos procedentes de los estiércoles animales, compost y desechos.
- Fijación de nitrógeno por las leguminosas y otras especies de plantas.
- N en residuos agrícolas (aéreos y subterráneos).
- Mineralización de N relacionada con la pérdida de materia orgánica del suelo.

### **II. 1.5.2. Emisiones indirectas de N<sub>2</sub>O**

El IPCC 2006 menciona las emisiones indirectas y las estima por alguna o varias de las vías siguientes:

- Volatilización de N en la atmósfera en forma de NH<sub>3</sub> y óxidos de N (NO<sub>x</sub>) y deposición sobre los suelos y las aguas superficiales.
- Lixiviación y escurrimiento del nitrógeno.
- Formación en la atmósfera de N<sub>2</sub>O a partir de NH<sub>3</sub> que se produce a partir de la combustión de combustible fósil, quemado de la biomasa y los procesos de la industria química (IPCC, 2006).

## II. 2. Mitigación de los gases de efecto invernadero

### II. 2.1. Mitigación del metano

Para un óptimo rendimiento del rumen, la metanogénesis es esencial, ya que evita la acumulación del hidrógeno que puede inhibir la actividad de la deshidrogenasa involucrada en la oxidación de los cofactores reducidos (NADH, NADPH, FADH), por lo que es necesario considerar este proceso, así como las vías metabólicas para desarrollar estrategias que pueden controlar la producción de metano. Todos los intentos de reducir la producción de metano deben tener uno o más de los siguientes propósitos:

- Una reducción de la producción de hidrógeno sin alterar la digestión de los alimentos.
- Una estimulación de la utilización del hidrógeno hacia los canales que conducen a los productos finales beneficiosas para el animal.
- La inhibición de arqueobacterias (número y/o actividad). Esto debe ser idealmente realizado con una estimulación concomitante de las vías que consumen el hidrógeno con el fin de evitar un aumento de la presión parcial de hidrógeno en el rumen y su efecto negativo sobre la fermentación (Martin *et al.*, 2009).

#### II. 2.1.1. Estrategias nutricionales para la mitigación del metano

##### II. 2.1.1.1. Uso de forrajes

Según McAllister *et al.* (1996) y Moss *et al.* (2000) la producción de metano en rumiantes varía en función de **la madurez del forraje** ofrecido. Por ejemplo en un estudio realizado por Benchaar *et al.* (2001) la producción de metano disminuyó hasta 15% cuando se sustituyó el heno de alfalfa en el estado mitad de floración por el heno de alfalfa antes de florecer, cuando estas pérdidas estaban expresadas por unidad de energía digestible, observándose lo contrario cuando se expresaron en porcentaje de ingestión de energía bruta.

Por otra parte la producción de metano fue menor cuando se introdujeron **leguminosas** en la dieta. De acuerdo con el modelo de predicción de Benchaar *et al.* (2001), la

sustitución del heno de fleo por alfalfa provoca una disminución de la emisión de CH<sub>4</sub> del 21%. La disminución de la cantidad de metano emitido con la dieta de leguminosa en comparación con la dieta de hierba se puede atribuir a la cantidad baja de carbohidratos estructurales en la leguminosa y su rápido paso a través del rumen que promueve el proceso de fermentación para la producción de propionato (Johnson y Johnson, 1995).

Ahora bien, otros autores han encontrado un efecto contrario con el uso de leguminosas en las dietas (Waghorn *et al.*, 2002; O'Mara *et al.*, 2008), con aumentos en las emisiones de metano con las leguminosas debido a un mayor consumo voluntario, una mayor digestibilidad de la dieta y una modificación de los parámetros de fermentación. Cuando Carulla *et al.* (2005) sustituyeron el ensilado de raigrás por ensilado de trébol o de alfalfa, observaron un aumento en las emisiones de metano. Finalmente, otros trabajos no han encontrado diferencias entre gramíneas y leguminosas (Beever *et al.*, 1985; Van Dorland, 2007).

Las diferencias encontradas, tanto entre leguminosas como entre gramíneas, pueden ser debidas a las diferencias entre especies o a la diferente concentración de compuestos secundarios, como taninos y saponinas. Es posible que las diferencias en la calidad nutricional entre especies puedan modificar las emisiones del metano. Ellis *et al.* (2012) sugieren que la alimentación de forrajes con mayor concentración de azúcares o proteína disminuye hasta 13% la producción de metano. La presencia de taninos en muchas especies de leguminosas produciría una reducción en las emisiones de metano entérico (Hess *et al.*, 2004), sin embargo este efecto no está asociado a todas las especies leguminosas. Los taninos son polifenoles que se unen a las proteínas y los carbohidratos de la dieta (Patra y Saxena, 2010) con lo que disminuirían su degradabilidad, la actividad enzimática de las bacterias ruminales, la población de bacterias y protozoos y, en consecuencia, disminuirían la producción del metano (Tavendale *et al.*, 2005; Johnson *et al.*, 2007). Ahora bien, el efecto de los taninos en las leguminosas sobre la producción de metano es muy variable y depende del tipo de taninos y su concentración. Así, se ha observado que la inclusión de taninos condensados en la dieta de ovejas, disminuye la metanogénesis (Carulla *et al.*, 2005) mientras que otros autores no han encontrado efectos significativos (Beauchemin *et al.*, 2007).

Aunque los resultados obtenidos con las leguminosas más utilizadas, como el trébol y la alfalfa, indican que reducen las emisiones de metano entérico, debido a un mayor consumo de alimento y aumento en las tasas de paso, existen diferencias importantes entre leguminosas por su composición nutricional, su digestibilidad y presencia o no de metabolitos secundarios (Tavendale *et al.*, 2005), por lo que cada leguminosa debe considerarse individualmente.

También **el método de preservación** del forraje influye a la producción de metano, como lo demostraron Benchaar *et al.* (2001) cuando ofrecieron ensilado de alfalfa. Estos autores observaron una reducción de las emisiones de metano cuando están expresadas en porcentaje de ingestión de energía bruta y en porcentaje de energía digestible (32% y 28%, respectivamente), cuando ofertaron ensilado de alfalfa en la ración en lugar de una dieta que incluyó heno de alfalfa.

**La molienda o la peletización** de los forrajes para mejorar su utilización por los rumiantes, mostraron una reducción en las pérdidas de CH<sub>4</sub> por unidad de consumo de alimentos del 20-40% cuando hay un consumo elevado de la dieta (Johnson *et al.*, 1996). La baja digestibilidad de la fibra, que reduce la materia orgánica disponible en el rumen y aumenta la velocidad del paso del forraje molido o granulado, puede explicar la disminución del CH<sub>4</sub> (Le-Liboux y Peyraud, 1999). Estos efectos son más pronunciados en los animales alimentados *ad libitum* en comparación con aquellos cuya ingestión está limitada. Sin embargo, la molienda fina de forraje no ha demostrado ser rentable para los productores de leche, debido a la mayor incidencia de la acidosis y bajo contenido de grasa de la leche producida.

Cuando se ha estudiado el efecto del **pastoreo** sobre las emisiones de metano entérico, se ha observado que las emisiones descienden un 22% cuando se compara el pastoreo continuo frente a un pastoreo rotacional debido a un aumento en la calidad del forraje (DeRamus *et al.*, 2003) al disminuir el contenido en carbohidratos estructurales.

#### **II. 2.1.1.2. Concentrados**

Se ha observado que el aumento del **nivel** de concentrado en la dieta reduce la emisión de CH<sub>4</sub> como proporción del aporte de energía, como se muestra en el trabajo realizado

por Benchaar *et al.* (2001). Estos autores estudiaron el comportamiento del rumen y su respuesta a las diferentes proporciones de concentrado mixto (45% de harina de maíz y 55% de harina de soja) en la dieta sobre la producción de AGV y la producción del metano. Se observó que con una relación forraje: concentrado de 30:70, la eficiencia microbiana ruminal y el pH disminuyeron, resultando en un aumento de la producción del ácido propiónico y una reducción del CH<sub>4</sub> cuando se expresaba tanto en porcentaje de energía bruta ingerida como en porcentaje de energía digestible. También en el mismo estudio, se mostró que la utilización de un concentrado de **composición** diferente (55 % de harina de soja y 45% de cebada o de pulpa de remolacha) afecta a la producción de metano, que disminuyó hasta un 23 % (EB ingerida o ED) respecto al anterior. Los mismos resultados fueron observados por Kujawa, (1994) en bueyes alimentados con pienso de alto contenido en fibra digestible que produjeron menos metano (4-5% de la EB ingerida).

## **II. 2.1.2. Otras estrategias para la mitigación del metano**

### **II. 2.1.2.1. Adición de los lípidos**

Para mejorar la producción de leche, aumentar la densidad energética de las dietas y para modificar la composición de los ácidos grasos de la leche, la adición de la grasa es una práctica habitual (Murphy *et al.*, 1995; Ashes *et al.*, 1997). También se ha observado que la adición de grasa disminuye la producción de metano. En el estudio *in vitro* de Dohme *et al.* (2000) observaron que mediante la adición de 53g/kg MS de aceite de palmiste, aceite de coco, o aceite de colza, que se caracterizan por los ácidos grasos de cadena media, la producción de CH<sub>4</sub> bajó un 34, 21 o 20 % respectivamente. Machmüller y Kreuzer (1999) observaron que en ovejas alimentadas con aceite de coco con niveles de 3,5 y 7%, la producción de metano disminuyó hasta el 28 y 73% respectivamente, pero se ha observado que estas cantidades de aceite de coco redujeron el conteo de los protozoarios ciliados 1,0 10<sup>5</sup>/mL y 0,3 10<sup>5</sup>/mL respectivamente en comparación con la muestra control (1,7 10<sup>5</sup>/mL) como consecuencia del efecto tóxico sobre los protozoos y las bacterias metanogénicas de los ácidos grasos saturados del aceite de coco tiene un (Dong *et al.*, 1997a; Machmüller y Kreuzer, 1999). Los ácidos grasos de cadena larga liberados por la lipólisis en el rumen, son inhibidores no competitivos de la metanogénesis, a pesar de su hidrogenación (McAllister *et al.*, 1996).

Van der Honing *et al.* (1981) observaron que al ofrecer un 5% de sebo o aceite de soja en la dieta, las pérdidas de metano por vacas lechera alcanzaron hasta un 10-15%. Esta reducción se atribuyó a la disminución del sustrato fermentable más que al efecto directo sobre la metanogénesis.

#### II. 2.1.2.2. Aceites Esenciales

Existe un interés creciente en el uso de productos naturales como aditivos alimentarios para manipular la fermentación entérica y posiblemente reducir las emisiones de CH<sub>4</sub> de origen animal (Wallace *et al.*, 2002; Wenk, 2003). Los aceites esenciales son un grupo de compuestos secundarios de las plantas que son usados como aditivos naturales para rumiantes (Wallace *et al.*, 2002). Generalmente se extraen por destilación, a menudo mediante el uso de vapor, aunque otros procesos incluyen disolventes orgánicos. Estos extractos a partir de plantas (por ejemplo, de tomillo, menta, orégano, salvia) poseen propiedades características, principalmente de acción antibiótica (Wenk, 2003). Las propiedades antimicrobianas de aceites esenciales se han mostrado a través de estudios *in vitro* e *in vivo* para inhibir una serie de bacterias y levaduras y para controlar los gases de fermentación, la síntesis de AGV, los olores de desechos de animales y las bacterias patógenas humanas (Hammer *et al.*, 1999; Wallace *et al.*, 2002).

En un estudio *in vitro* (Agarwal *et al.*, 2009), donde se probó el efecto del aceite de menta (*Mentha piperita*) adicionándolo al medio con diferentes proporciones (0,33; 1,0 y 2,0  $\mu\text{l ml}^{-1}$ ) sobre la producción de gas y CH<sub>4</sub> y usando un sustrato de paja de trigo y concentrado en proporción 1:1 y líquido ruminal como fuente de inóculo, se observó una reducción de la producción de metano de 19,9; 46,0 y 75,6%, respectivamente con cada dosis empleada. Ahora bien, los niveles altos de aceite de menta fueron tóxicos para la microbiota ruminal, por lo tanto, había que evaluar el efecto de la dosis de 0,33  $\mu\text{l ml}^{-1}$  en más detalle en estudios *in vivo*. También, adicionando 0; 1 y 10% de aceites esenciales a 0,5 g de festuca alta y concentrado con un ratio de 2:8 o 8:2, en un estudio de Lee y Ha (2002) para examinar la fermentación y la producción de gas *in vitro*, se demostró que una suplementación del 10% de aceite aumentaba el pH ruminal y bajaba el NH<sub>3</sub>-N, la concentración de los AGV, y la producción acumulada de CH<sub>4</sub> tras 48 hora de incubación, mientras que no ocurrió ningún efecto sobre la producción de metano usando un 1% de aceite en ambos sustratos.

En otro estudio, Broudiscou *et al.* (2000) testaron 13 extractos de plantas para estudiar su efecto sobre la fermentación *in vitro*. Observaron una variación en el número de los protozoos y una disminución de la producción de metano del 8,2% con *Salvia officinalis*, y del 14,2% con *Equisetum arvense*, mientras que se produjo un aumento del 13,7% con *Lavandula officinalis* y del 7,7% con *Solidago virgaurea*, indicando que los extractos de plantas no tienen el mismo modo de acción.

### **II. 2.1.2.3. Probióticos**

Los probióticos se definen como suplementos de los piensos, constituidos por microorganismos vivos, que benefician a los animales hospedadores mejorando el equilibrio microbiano digestivo (McDonald *et al.*, 2011). La información sobre el uso de los probióticos sobre la producción de metano en ganado lechero, es escasa. Los efectos de los aditivos microbianos más usados, *Saccharomyces cerevisiae* y *Aspergillus oryzae* sobre la fermentación en el rumen fueron estudiados *in vitro* (Frumholtz *et al.*, 1989; Mutsvangwa *et al.*, 1992). Según el estudio de Frumholtz *et al.* (1989), el *Aspergillus oryzae* disminuyó la producción de CH<sub>4</sub> el 50% como resultado de la reducción de la población de protozoos. Mientras que el *Saccharomyces cerevisiae* redujo las emisiones de CH<sub>4</sub> el 10% y, esta reducción no se mantuvo durante un largo período.

### **II.2.1.2.4. Ionóforos**

Los ionóforos son sustancias altamente lipofílicas que son capaces de proteger y reubicar la carga de iones y facilitar su movimiento a través de membranas (Mathison *et al.*, 1998). La monensina y el lasalocid sódico son ionóforos que se usaron como antibióticos para disminuir la producción de metano hasta un 25% (Chen y Wolin, 1979). Estos ionóforos no afectan a los metanógenos, pero sí a otras poblaciones microbianas que promueven la fermentación hacia la producción de ácido propiónico. Posteriormente se observó que el periodo de reducción es corto (hasta 2 semanas) y que los valores retornan al inicio rápidamente. La Unión Europea, en el marco de una política de seguridad alimentaria, decidió la prohibición a partir del 1 de enero 2006 del uso sistemático de estos antibióticos en la alimentación y una regulación más estricta de su uso por prescripción veterinaria.

#### **II. 2.1.2.5. Bromoetanosulfonato (BES)**

Es un inhibidor potente de la metanogénesis, ya que es un análogo estructural de la coenzima M utilizada por las bacterias metanogénicas (Mathison *et al.*, 1998). Dong *et al.* (1997b) observaron una reducción de la producción de metano del 71% sin que el BES usado afecte a la digestibilidad de la materia orgánica y las concentraciones de AGV en el rumen artificial (Rusitec). Esta reducción de CH<sub>4</sub> se atribuyó al efecto tóxico de BES sobre las bacterias metanogénicas. Sin embargo un estudio con ovejas demostró que, aunque este inhibidor tiene un efecto depresivo sobre la producción de metano, su efecto persistió solamente 3 días (Immig *et al.*, 1995), sugiriendo una adaptación de las bacterias al BES.

Los intentos de mitigación de metano son diversos, otros todavía están por verificar, como la selección genética de los animales basándose en diversos parámetros tal como la velocidad de paso o tiempo de retención del alimento en el rumen que afecta a la producción de propionato y el rendimiento de la microbiota. En la tabla II.5 se muestra un resumen de los efectos encontrados relativos al uso de diferentes estrategias de mitigación de metano.

Tabla II.5. Resumen de los efectos de diferentes estrategias de mitigación de CH<sub>4</sub>

Estrategias de mitigación	Factores	Efecto sobre CH <sub>4</sub>		Referencias
		Aumento	Disminución	
Uso de forrajes	Estado de madurez		X	Benchaar <i>et al.</i> (2001)
	Presencia de leguminosa		X	Johnson y Johnson (1995) Benchaar <i>et al.</i> (2001) Hess <i>et al.</i> (2004)
		X		Waghorn <i>et al.</i> (2002) Carulla <i>et al.</i> (2005) O'Mara <i>et al.</i> (2008)
	Taninos		X	Tavendale <i>et al.</i> (2005) Johnson <i>et al.</i> (2007)
		X		Carulla <i>et al.</i> (2005)
	Método de conservación de Ensilado		X	Benchaar <i>et al.</i> (2001)
	Molienda/ Peletización		X	Johnson <i>et al.</i> (1996) Le-Liboux y Peyraud (1999)
Pastoreo continuo		X	DeRamus <i>et al.</i> (2003)	
Uso de concentrados	Incremento en el nivel en la dieta		X	Benchaar <i>et al.</i> (2001)
	Composición		X	Kujawa (1994) Benchaar <i>et al.</i> (2001)
Otros	Lípidos		X	Van der Honing <i>et al.</i> (1981) Machmüller y Kreuzer (1999) Dohme <i>et al.</i> (2000)
	Aceites esenciales		X	Broudiscou <i>et al.</i> (2000) Lee y Ha (2002) Agarwal <i>et al.</i> (2009)
		X		Broudiscou <i>et al.</i> (2000)
	Probióticos		X	Frumholtz <i>et al.</i> (1989)
	Ionóforos		X	Chen y Wolin (1979)
	Bromoetansulfonato		X	Dong <i>et al.</i> (1997b)

## II. 2.2. Mitigación del óxido de nitroso

El nitrógeno urinario es más lábil que el N de origen fecal y está considerado como el primer contribuyente en las pérdidas en forma de NH<sub>3</sub> y N total, por eso es muy

importante reducir estas pérdidas y/o derivar la excreción de nitrógeno a través de las heces (Hristov, 2013).

Al bajar la concentración de la proteína bruta en la dieta para ganado lechero y de carne, Hristov *et al.*, (2011) obtuvieron una reducción de las pérdidas de N del estiércol pero estas intervenciones tienen que estar equilibradas con las necesidades de los animales en proteína para evitar la disminución de la producción de leche, como lo demostró Lee *et al.* (2011; 2012) cuando bajaron la cantidad de PB hasta el 14% en la dieta.

Por otra parte mejorar el drenaje de las instalaciones ganaderas puede disminuir las emisiones de NH<sub>3</sub>, así como la colecta diaria del estiércol y/o la aplicación de inhibidores para disminuir estas emisiones (Hristov *et al.*, 2011).

## **II. 3. Determinación de producción y emisión de metano**

La determinación de las emisiones **directas** de metano en los rumiantes resulta compleja, cara y frecuentemente incompleta. Las mediciones son difíciles de realizar sin cámaras respiratorias adecuadas. Asimismo, éstas necesitan de una gran inversión, por lo que se han desarrollado alternativas mediante marcadores **indirectos** y también se han desarrollado diferentes **modelos de estimación** de la emisión de metano a través de ecuaciones de predicción.

### **II. 3.1. Técnicas directas**

Las técnicas calorimétricas de respiración a partir de cámaras respiratorias o máscaras faciales han sido usadas con diferente efectividad para la determinación de las emisiones de metano (Johnson y Johnson, 1995). Estos equipos determinan el flujo total de aire en el sistema y la diferencia en la concentración de metano entre el aire inspirado y el espirado. Las cámaras respiratorias tienen la ventaja de que miden las emisiones de metano tanto proveniente de la fermentación ruminal como de las fermentaciones que se dan postruminalmente. Asimismo aportan información de la variabilidad de las emisiones durante el día por los animales y las variaciones entre animales (Grainger *et al.*, 2007). Sin embargo, su elevado coste de construcción y de mantenimiento, la mano de obra cualificada necesaria para su manejo, la restricción de movimiento de los

animales y los efectos sobre el consumo voluntario constituyen sus principales desventajas.

Las máscaras faciales se diseñaron con el fin de reducir costes, pero tienen los mismos inconvenientes que las cámaras respiratorias y, además no tienen la capacidad de medir las emisiones de metano de las fermentaciones postruminales. La propia concepción de ambos diseños impide su uso con animales en pastoreo.

### **II.3.2. Técnicas indirectas**

Para evitar los problemas de las técnicas directas de medición del metano generado, se han desarrollado diferentes métodos indirectos mediante el uso de marcadores. Esta técnica se basa en la liberación de una cantidad conocida del gas marcador contenido en un tubo pre-calibrado y permeable que se coloca en el rumen, y en la medición subsiguiente de la relación de este gas y el metano en muestras de aire espirado. Debe conocerse la tasa de liberación del gas marcador antes de su inserción en el rumen (Johnson *et al.*, 1994). Los marcadores isotópicos se han utilizado mediante el marcado del CH<sub>4</sub> con <sup>3</sup>H y/o <sup>14</sup>C. La mayor limitación con los marcadores isotópicos es la dificultad en la preparación de la solución debido a la baja solubilidad del metano. Como marcador no isotópico se ha propuesto el hexafluoruro de azufre (SF<sub>6</sub>), un gas inerte cinco veces más pesado que el aire, incoloro, inodoro, no tóxico y no inflamable que se deposita en el rumen. También se ha propuesto como gas marcador el NO<sub>2</sub> por lo que es posible cuantificar simultáneamente ambos gases en la corriente de aire. Se coloca en el animal una cabezada que sostiene un capilar sobre el morro, a través del cual se colectan muestras de aire espirado que se almacenan en un tubo de vacío colocado en el cuello del animal y por cromatografía de gases se determina el CH<sub>4</sub> y el SF<sub>6</sub> o el NO<sub>2</sub>. La tasa de emisión de CH<sub>4</sub> se determina a partir de la relación de la concentración CH<sub>4</sub>: NO<sub>2</sub> o CH<sub>4</sub>: SF<sub>6</sub> y la tasa conocida de liberación del NO<sub>2</sub> o SF<sub>6</sub> respectivamente. El uso de estos marcadores tiene la ventaja de no limitar al animal en su comportamiento normal en pastoreo y pueden determinar entre el 93 y el 98% del total de metano producido comparado con el uso de cámaras respiratorias (McCaughey *et al.*, 1999).

### **II.3.3. Métodos *in vitro***

Las simulaciones *in vitro* del medio ambiente ruminal han sido frecuentemente usadas por su rapidez y bajo coste. Además, pueden fijarse factores que influyen en la fermentación que, en ensayos *in vivo* pueden influir en los resultados. Este hecho constituye simultáneamente una ventaja, al poder aislar factores concomitantes, y una desventaja, por no tener en cuenta factores que se darían *in vivo*. La producción de CH<sub>4</sub> en rumiantes alimentados con base en forraje puede ser estimada con relativa exactitud mediante incubaciones *in vitro* que midan la degradabilidad del sustrato y la producción de gas durante la incubación (Blümmel *et al.*, 2005).

### **II.3.4. Ecuaciones de predicción**

Los modelos matemáticos permiten predecir la producción de CH<sub>4</sub> del ganado sin realizar experimentos extensos y costosos. Los modelos utilizados pueden ser clasificados o como modelos estadísticos que relacionan la ingestión de alimentos directamente con la producción de CH<sub>4</sub> o como modelos mecanicistas y dinámicos que estiman la producción de CH<sub>4</sub> utilizando descripciones matemáticas de la fermentación bioquímica del rumen (Kebreab *et al.*, 2006). Aunque muchos modelos estadísticos tuvieron bastante éxito en la predicción de la producción de CH<sub>4</sub>, algunos tienen datos que son difíciles de medir y otros pueden tener dificultades en la estimación de la producción de metano fuera de los intervalos dentro de los que han sido desarrollados (Wilkerson *et al.*, 1995).

En los años 40 se propuso una ecuación de predicción para la emisión de metano a partir de la estequiometría de la conversión de los carbohidratos de la dieta a AGV (Bratzler y Forbes, 1940), asumiendo que todo el exceso de H<sub>2</sub> es convertido en metano y no hay hidrógeno asociado a la síntesis microbiana. Las estimaciones así realizadas tienen una gran inexactitud pero es útil a efectos comparativos (Johnson y Johnson, 1995).

Un trabajo clásico de Blaxter y Clapperton (1965) consideró la digestibilidad del alimento consumido para estimar la producción de metano y es la base de la mayoría de los modelos de estimación actualmente utilizados. Moe y Tyrrel (1979) mejoraron la exactitud de la predicción incluyendo en el modelo el contenido en celulosa,

hemicelulosa y carbohidratos no fibrosos. Benchaar *et al.* (1998) señalan que las ecuaciones de predicción de producción de metano requieren información de consumo de materia seca, composición química de la dieta y su degradabilidad, tasa de paso por el retículo-rumen y pH del fluido ruminal. Sin embargo, existe la dificultad de conocer algunos de los valores necesarios para algunos modelos de predicción. Ellis *et al.* (2007) propusieron modelos de predicción de producción de CH<sub>4</sub> a partir del análisis de los resultados de 29 artículos publicados entre 1964 y 2005, las cuales mostraron mejor predicción y mayor facilidad de uso para estimar las emisiones de metano que las ecuaciones propuestas inicialmente. Varios autores (Yates *et al.*, 2000; Mills *et al.*, 2003; IPCC, 2006; Ellis *et al.*, 2007) citan modelos basados en diferentes parámetros como el consumo de materia seca, el consumo de energía bruta o digestible e incluso basándose en la composición de los alimentos ya que su contenido de NFD, FAD etc.

El Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático (IPCC) se creó en 1988 a iniciativa del Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA) y la Organización Meteorológica Mundial (OMM) con la finalidad de proporcionar evaluaciones integrales del estado de los conocimientos científicos, técnicos y socioeconómicos sobre el cambio climático, sus causas, posibles repercusiones y estrategias de respuesta. El IPCC es un órgano científico al que miles de científicos de todo el mundo aportan contribuciones voluntarias, en calidad de autores y revisores, que examinan y evalúan la más reciente bibliografía científica, técnica y socioeconómica que se produce en el mundo, pertinente para la comprensión del cambio climático. Las directrices del IPCC de 2006 clasifican los métodos asociados al sector de Agricultura, Silvicultura y otros usos del Suelo en tres niveles:

- Nivel 1 es el método básico.
- Nivel 2 es el nivel intermedio.
- Nivel 3 es el más exigente en términos de complejidad y requisitos de datos.

Los factores de emisión sugeridos en la metodología publicada por el IPCC (Tubiello *et al.*, 2015), asociados el procedimiento de estimación más sencillo (Nivel 1) son bastante imprecisos, algo que el IPCC reconoce en sus publicaciones, pero es cierto que los mismos constituyen un primer paso en largo y arduo camino asociado en un estimación rigurosa. Ahora bien, están disponibles un gran número de datos, por ejemplo FAOSTAT ([faostat3.fao.org](http://faostat3.fao.org)) o IFIA ([www.fertilizer.org](http://www.fertilizer.org)) en las que se han registrado

valores para muchos de los parámetros que se utilizan en los cálculos recomendados. Accediendo a la base de datos apropiada y desarrollando un método de manipulación de datos coherente es posible desarrollar una estimación adecuada.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**



### **III. Material y métodos**

#### **III.1. Lugar experimental**

Los resultados de este trabajo derivan de los datos obtenidos en dos ensayos llevados a cabo en la primavera y el otoño de 2013 en las instalaciones de la Unidad del Leche del Área de Nutrición, Pastos y Forrajes del Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (SERIDA) del Principado de Asturias, Villaviciosa (España) ubicado geográficamente en la zona costera central de Asturias, comarca agraria de Gijón con latitud 43° 28' 50'' N, longitud 5° 26' 27'' W y una altitud de 10 msnm.

#### **III.2. Animales y dietas**

En el ensayo de primavera se usaron 10 vacas de raza Holstein que al inicio del ensayo tenían un peso vivo de  $611 \pm 22,6$  kg (media  $\pm$  ee), con una condición corporal de  $2,7 \pm 0,11$  (escala de 1 a 5) y una producción de leche de  $27,4 \pm 1,67$  kg/día a los  $123 \pm 12$  días de lactación con  $2,4 \pm 0,17$  lactaciones. En el ensayo de otoño, se usaron otras 10 vacas Holstein con  $77 \pm 5$  días en leche,  $2,2 \pm 0,44$  lactaciones,  $616 \pm 26,3$  kg de peso vivo,  $2,7 \pm 0,09$  de condición corporal y  $28,7 \pm 2$  kg/d de leche.

En ambos ensayos las vacas fueron divididas al azar en 2 grupos de 5 vacas cada uno sobre los que se testaron las raciones completas mezcladas (TMR) en un diseño cross over de dos periodos por dos dietas. Las TMR fueron formuladas de acuerdo al NRC (2001) y se describen en la tabla III.1. En el ensayo de primavera, la ración convencional estaba constituida con ensilado de raigrás italiano, ensilado de maíz, paja de cereal y concentrado. La ración alternativa estaba compuesta por ensilado de haba y colza y de maíz, paja y concentrado. En otoño el ensilado de maíz se sustituyó por heno de alfalfa por razones de disponibilidad. Adicionalmente, durante los ordeños se administró un concentrado como suplemento energético ajustado al nivel de producción de cada vaca. Durante el ensayo de primavera las vacas permanecían en el pasto 12 horas y 7 horas en otoño, en prados donde predominaban *Lolium perenne* L. y *Agrostis*

*spp.* Los animales siempre tuvieron libre disposición de agua limpia y suplemento de minerales y vitaminas.

Tabla III.1. Composición de ingredientes de las dietas TMR convencional y alternativa en los dos ensayos de primavera y otoño.

Ingredientes (%MS)	Primavera		Otoño	
	Alternativa	Convencional	Alternativa	Convencional
Ensilado de maíz <sup>1</sup>	32,56	35,30	-	-
Ensilado de raigrás <sup>2</sup>	-	36,85	-	32,38
Ensilado haba-colza <sup>3</sup>	43,53	-	37,92	-
Heno de alfalfa	-	-	23,35	25,44
Paja	15,62	16,16	6,58	7,16
Concentrado	8,29	11,69	32,15	35,02

<sup>1</sup> Maíz cultivado con abono químico en la dieta convencional y con abono orgánico en la alternativa.<sup>2</sup> Ensilado de raigrás italiano cultivado en el modo convencional.<sup>3</sup> Ensilado de haba y colza forrajera cultivadas con una fertilización alternativa .

Los ensilados contrastados fueron de raigrás italiano (*Lolium multiflorum* cv. Barextra, RI) y de un cultivo asociado de haba y colza (*Vicia faba* cv. Prothabon y *Brassica napus* cv. Fricola, HC), como cultivos de invierno, en rotación con el maíz. Para su obtención se usaron dos parcelas adyacentes de 1,7 ha cada una. El raigrás italiano se cultivó en una parcela manejada en condiciones convencionales (C), con una dosis de siembra de 45 kg/ha, fertilizándose con abonos químicos: 60 kg/ha de N, 40 kg/ha de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> y 120 kg/ha de K<sub>2</sub>O en presiembra y 70 UF de N en cobertera tras el primer corte para ensilado. Se realizaron 2 cortes de hierba que fueron conservados en rotopacas. El cultivo asociado de haba-colza con un manejo alternativo (A) orientado a una mayor sostenibilidad medioambiental y económica fue sembrado con haba forrajera (150 kg/ha) en asociación a colza forrajera (8 kg/ha). La fertilización de esta parcela se realizó con estiércol (36 t/ha) y purín de vacuno lechero (32 m<sup>3</sup>/ha) fue aprovechado en un único corte cuando el grano estaba en estado patoso-vítreo y conservado en silos trinchera.

Como cultivo de verano, se sembraron ambas parcelas con maíz (*Zea mays*, cv. Crazy) con una densidad de siembra de 90.000 plantas por hectárea. En la parcela

convencional, previo a la siembra del maíz, se aportaron 125 kg N/ha de N, 150 kg/ha de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, 250 kg/ha de K<sub>2</sub>O, seguidos de 75 kg N/ha en cobertura cuando las plantas de maíz alcanzaron los 20 cm y para el control de flora arvense se utilizaron 4 L/ha de herbicida de preemergencia. En la parcela alternativa el maíz fue abonado con 33 t/ha de estiércol y 84 m<sup>3</sup>/ha de purín de vacuno. La dosis de herbicida fue de 2 L/ha del mismo producto que en el manejo convencional para poder ver la eficiencia herbicida de la colza. Los ensilados de maíz de la parcela convencional y alternativa fueron utilizados en las raciones del ensayo de primavera formando parte de la ración convencional y alternativa respectivamente. Los restantes forrajes utilizados; paja en ambos ensayos y heno de alfalfa en el ensayo de otoño fueron adquiridos en el mercado junto con los concentrados.

### **III.3. Diseño experimental**

Cada ensayo consistió en 2 periodos de 21 días cada uno, incluyendo 14 de adaptación a la dieta y 7 de muestreo y colección de datos. Las vacas fueron pesadas y se evaluó su condición corporal al inicio y al final de cada periodo de muestreo.

Las vacas eran ordeñadas dos veces al día, registrándose la producción de ambos ordeños. En el ensayo de primavera, las vacas permanecieron en el pasto desde el ordeño de la tarde hasta el de la mañana siguiente. En el ensayo de otoño, los animales tuvieron acceso al pasto desde las 11 de la mañana hasta el ordeño de la tarde.

Las raciones TMR se elaboraban diariamente, registrándose el consumo individual por vaca mediante un sistema computarizado de control de la ingesta. El consumo de pienso suplementario se registró diariamente en el dispensador automático integrado en el equipo de ordeño.

El consumo de hierba en pastoreo se estimó siguiendo el método de rendimiento animal propuesto por Macoon *et al.* (2003). Este método estima la ingestión de hierba en los animales en pastoreo a partir del cálculo de los requerimientos de energía neta del ganado y el aporte de energía neta con el consumo de alimento proporcionado en el establo. La diferencia entre estas determinaciones estima la cantidad de energía neta aportada por el pasto. Los requerimientos de energía neta de los animales se estiman a

partir de la aplicación de las ecuaciones de predicción del NRC (2001) para cada tipo de necesidades del ganado lechero:

### III.3.1. Energía Neta de Mantenimiento ( $NEI_m$ ):

$$NELm = k(0,08 \times PV^{0,75}) \quad \text{[Ecuación 1]}$$

Donde  $PV^{0,75}$  es el peso metabólico y k una constante en función del número de parto: 1,2 en vacas de 1<sup>er</sup> parto, 1,1 en vacas de 2<sup>o</sup> parto y 1 en vacas de con 3 o más partos.

### III.3.2. Energía Neta de Gestación ( $NEI_g$ ):

$$NELg = \frac{\left[ (0,00318 \times D - 0,0352) \times \left( \frac{PTN}{45} \right) \right]}{0,218} \quad \text{[Ecuación 2]}$$

Donde D son los días en gestación y PTN es el peso de ternero al nacimiento en kg.

### III.3.3. Energía Neta de Lactación ( $NEI_l$ ):

$$NELl = kg\_leche\_día \times [0,3512 + (0,0962 \times \%grasa\_en\_leche)] \quad \text{[Ecuación 3]}$$

### III.3.4. Energía Neta debida al Cambio de peso ( $NEI_{pv}$ ):

Por cada kg de PV ganado por el animal los requerimientos se incrementaron en 5,12 Mcal de ENL, mientras que en el caso de pérdida de peso, se restaron de las necesidades totales 4,92 Mcal de ENL por cada kg de PV perdido.

### III.3.5. Energía Neta debida a la Actividad de pastoreo ( $NEI_p$ ):

Calculada según la ecuación propuesta por Rochinotti (1998):

$$NELp = 1,2kcal \times horas\_pastoreo \times PV^{0,75} \quad \text{[Ecuación 4]}$$

### III.3.6. Energía Neta debida a la actividad de desplazamiento (NEL<sub>d</sub>):

Estimada según el modelo sugerido en el AFRC (1993):

$$NEL_d = \frac{0,62cal}{kgPV \times distancia\_metros} \quad \text{[Ecuación 5]}$$

Como valor medio se considera que los animales recorrieron una distancia diaria promedio de 600 metros desde la parcela de pastoreo a la cuadra y sala de ordeño.

### III.4. Toma de muestras y análisis

En ambos ensayos, durante los 7 días de control de cada periodo, se tomaron diariamente una muestra de cada una de las raciones completas mezcladas. Estas muestras se mantuvieron congeladas hasta el final del periodo de ensayo, tras el cual, se descongelaban y se tomaba una alícuota de cada una de ellas para la realización de los análisis químicos. El concentrado suplementario se muestreó una vez al inicio de cada periodo de ensayo. La hierba de las praderas se muestreó el primer día de cada uno de los periodos de muestreo a la vez que se procedió al control de producción en ambos ensayos siguiendo la metodología descrita por Martínez-Fernández (1995).

Todas las muestras de los alimentos (TMR, concentrado y forrajes) fueron analizadas en el laboratorio de Nutrición Animal del SERIDA, Laboratorio Oficial del Principado de Asturias en materia de análisis de alimentos destinados al ganado, acreditado por la Entidad Nacional de Acreditación (ENAC) conforme a los criterios recogidos en la norma UNE-EN-ISO/IEC 17025 (Nº de expediente LE/930). El contenido de materia seca, cenizas, proteína bruta (PB), fibra bruta (FB), extracto etéreo (EE), y almidón de la TMR formuladas en base de raigrás italiano y los piensos, además de fibra neutro detergente (FND), y fibra ácido detergente (FAD) del forraje verde, se determinó por espectroscopia en el infrarrojo cercano (NIR), utilizando un equipo NIRSystem 5000, mientras que en las muestras de la mezcla *unifeed* basadas en Haba-Colza, al no existir ecuaciones de predicción NIR, fueron analizadas por vía húmeda para su fraccionamiento Weende (AOAC, 1984) y Van Soest (Van Soest *et al.*, 1991).

El contenido energético del forraje fresco, las raciones completas mezcladas y el pienso se estimó mediante la aplicación de la ecuación de predicción de NRC (1989) para estimar la energía neta:

$$EN = (0,1569 \times EM) - 0,07 \quad \text{[Ecuación 6]}$$

Dónde EM es la Energía Metabolizable en MJ/kg de MS.

El valor de la EM en el forraje verde fue estimado según el modelo de MAFF (1984) donde se expresó el coeficiente de digestibilidad de la materia orgánica (DMO) como porcentaje de materia orgánica digestible (MOD):

$$EM = k \times MOD \quad \text{[Ecuación 7]}$$

Dónde k tiene un valor de 0,16 por forrajes frescos, y la MOD se calcula con la formula

$$MOD = \%Materia\_Organicá \times \left( \frac{DMO}{100} \right) \quad \text{[Ecuación 8]}$$

Dónde DMO es la digestibilidad en vivo de la materia orgánica (%) estimada a partir de la digestibilidad enzimática de la materia orgánica (%) y del contenido en FND y PB (Riveros y Argamentería, 1987).

$$DMO = 5,76 + (0,57 \times De) + (0,36 \times FND) + (0,5 \times PB) \quad \text{[Ecuación 9]}$$

El valor de la EM en las TMR y el concentrado fue determinado tomando el valor promedio de la energía metabolizable calculada según dos ecuaciones diferentes, MAFF (1984) y ADAS (1985)

$$EM_{MAFF} = 10 \times (0,012 \times PB + 0,031 \times EE + 0,005 \times FB + 0,014 \times MELN) \quad \text{[Ecuación 10]}$$

$$EM_{ADAS} = 11,78 + (0,0654 \times PB) + (0,0665 \times EE^2) - (0,0414 \times EE \times FB) - (0,018 \times CEN) \quad \text{[Ecuación 11]}$$

El contenido en EB se estimó a partir de la composición química del alimento según la ecuación sugerida por Becker y Nehring, (1967).

$$EB(kcal/g) = 5,4 \times PB(g/kg) + 9,72 \times EE(g/kg) + 4,59 \times FB(g/kg) + 4,24 \times ELN(g/kg) \quad [\text{Ecuación 12}]$$

### III.5. Estimación de la producción de metano entérico

Para la estimación de las emisiones de CH<sub>4</sub> entérico, se utilizó como referencia las estimaciones a partir de las ecuaciones propuestas por el IPCC Tier 2 (IPCC, 2006) y que se calculan sobre la base de la ingesta de energía bruta y el factor de conversión del metano. El grado en el que la energía de los alimentos se convierte en CH<sub>4</sub> depende de varios factores alimentarios y animales interrelacionados.

El Factor de Emisión (EF) de CH<sub>4</sub> producto de la fermentación entérica se estimó a partir de la EB (MJ/vaca/año), el factor de conversión del metano (Y<sub>m</sub>), porcentaje de energía bruta del alimento convertida en metano y de la energía producida por kg de CH<sub>4</sub>.

$$EF = \frac{\left[ EB \times \left( \frac{Y_m}{100} \right) \times 365 \right]}{55,65} \quad [\text{Ecuación 13}]$$

Calculando Y<sub>m</sub> a partir de la digestibilidad de la energía (DE):

$$Y_m = -0,0038 \times DE^2 + 0,3501 \times DE - 0,8111 \quad [\text{Ecuación 14}]$$

Estimando la digestibilidad de la energía (DE) como la relación de la energía digestible sobre la energía bruta.

Finalmente las emisiones por fermentación entérica (CH<sub>4</sub>) se estimaron mediante la ecuación:

$$CH_4 = MSI \times EF \quad [\text{Ecuación 15}]$$

Donde MSI es la materia seca ingerida.

En comparación con este modelo de referencia, otras ecuaciones fueron consideradas para estimar las emisiones de metano por las vacas lecheras en función de diferentes factores: composición química del alimento, ingestión de materia seca y/o energía, proporción de forraje o concentrado en la ración.

Mills *et al.* (2003) propusieron unos modelos lineales de predicción a partir de la ingestión de MS, EM, composición de los alimentos y la proporción de forraje.

$$CH_4(Mj/d) = 5,93 + 0,92 \times MSI(kg/d) \quad [\text{Ecuación 16}]$$

$$CH_4(Mj/d) = 8,25 + 0,07 \times EM(Mj/d) \quad [\text{Ecuación 17}]$$

$$CH_4(Mj/d) = 7,30 + 13,13 \times N(kg/d) + 2,04 \times FAD(kg/d) + 0,33 \times AI(kg/d) \quad [\text{Ecuación 18}]$$

$$CH_4(Mj/d) = 1,06 + 10,27 \times \text{proporción}_{\text{ forraje}} + 0,87 \times MSI(kg/d) \quad [\text{Ecuación 19}]$$

Asimismo, propusieron unos modelos cuadráticos con los mismos factores:

$$CH_4(Mj/d) = 56,27 - 56,27e^{-0,028 \times MSI(kg/d)} \quad [\text{Ecuación 20}]$$

$$CH_4(Mj/d) = 45,89 - 45,89e^{-0,003 \times EM(kg/d)} \quad [\text{Ecuación 21}]$$

$$CH_4(Mj/d) = 45,98 - 45,98e^{\left[ -(-0,0011) \times \left( \frac{AI}{FAD} \right) + 0,0045 \right] \times EM(kg/d)} \quad [\text{Ecuación 22}]$$

De la misma manera que Mills, Ellis *et al.* (2007) propusieron unos modelos lineales de predicción de la cantidad de metano producida a partir de los mismos factores.

$$CH_4(Mj/d) = 3,23 + 0,809 \times MSI(kg/d) \quad [\text{Ecuación 23}]$$

$$CH_4(Mj/d) = 8,56 + 0,39 \times \text{Forraje}(\%) \quad [\text{Ecuación 24}]$$

$$CH_4(Mj/d) = 4,08 + 0,0678 \times EM(Mj/d) \quad [\text{Ecuación 25}]$$

$$CH_4(Mj/d) = 3,14 + 2,11 \times FND(kg/d) \quad [\text{Ecuación 26}]$$

$$CH_4(Mj/d) = 5,87 + 2,43 \times FAD(kg/d) \quad [\text{Ecuación 27}]$$

$$CH_4(Mj/d) = 1,21 + 0,0588 \times EM(Mj/d) + 0,0926 \times \text{forraje}(\%) \quad [\text{Ecuación 28}]$$

$$CH_4(Mj/d) = 1,64 + 0,0396 \times EM(Mj/d) + 1,45 \times FND(kg/d) \quad [\text{Ecuación 29}]$$

$$CH_4(Mj/d) = 2,16 + 0,493 \times MSI(kg/d) - 1,36 \times FAD(kg/d) + 1,97 \times FND(kg/d) \quad [\text{Ecuación 30}]$$

Yates *et al.* (2000) propusieron una ecuación lineal a partir de la proporción de concentrado, de la materia seca ingerida y de la FND.

$$CH_4(Mj/d) = 1,36 + 1,21 \times MSI - 0,825 \times \text{concentrado}(\%) + 12,8 \left( \frac{FND}{MSI} \right) \quad [\text{Ecuación 31}]$$

### III.6. Estimación de las emisiones de metano producidas por la gestión del estiércol

Los principales factores que inciden en las emisiones de CH<sub>4</sub> son la cantidad de estiércol que se produce y la porción que se descompone anaeróbicamente. La primera depende de la tasa de producción de desechos por animal y de la cantidad de animales, mientras que la segunda depende de cómo se gestiona el estiércol (IPCC, 2006).

Para estimar la emisión de metano a partir del estiércol y del purín se aplicó:

$$CH_{4\text{Estiércol}} = VS \times 0,67 \times B_0 \times \frac{MCF}{100} \times EU \quad [\text{Ecuación 32}]$$

Dónde:

CH<sub>4</sub> Estiércol = emisiones de CH<sub>4</sub> por la gestión del estiércol kg CH<sub>4</sub> vaca<sup>-1</sup>

VS = Sólidos volátiles excretados kg MS vaca<sup>-1</sup>. Se estiman a partir de:

$$VS = \left[ EB_{\text{ingerid}} \times \left( 1 - \frac{\text{Digestibilidad} - EB}{100} \right) + (\text{Energía} - \text{Orina}) \right] \times \left( \frac{1 - Cen}{18,45} \right) \quad [\text{Ecuación 33}]$$

B<sub>0</sub> = Capacidad máxima de producción de metano del estiércol (0,18 m<sup>3</sup> CH<sub>4</sub>/kg VS)

0,67 = Factor de conversión de volumen de metano a kg CH<sub>4</sub>

MCF = Factor de conversión de metano. Para climas templados cuando el estiércol se almacena sin cubierta se considera el 77%

EU = Porcentaje del uso del estiércol. Cuando el estiércol se almacena sin cubierta se considera el 25,2%.

### III.7. Estimación de las emisiones de nitroso producidas por la gestión del estiércol

Las emisiones directas del óxido de nitroso provienen de los procesos naturales de nitrificación y desnitrificación. Para estimar estas emisiones es mejor emplear factores de emisión específicos a los diferentes sistemas de gestión, teniendo en cuenta la variabilidad en la duración del almacenamiento y sus condiciones tales como la aireación y la temperatura así que los tipos de tratamiento.

$$KgN_2O/vaca = 0,48 \times \frac{kgPV}{1000} \times EU \times EF \times \frac{44}{28} \quad \text{[Ecuación 34]}$$

Dónde:

0,48 = La tasa de excreción de Nitroso

EF = Factor de emisión de nitroso a partir del estiércol. Se considera 0,01 para climas templados cuando el estiércol se almacena sin cubierta.

Para estimar las emisiones indirectas de N<sub>2</sub>O de la gestión del estiércol se requiere la fracción de pérdida de nitrógeno debida a la volatilización y el factor de emisión indirecta de N<sub>2</sub>O relacionado con esta perdida.

$$kgN_2O/vaca = N_{volatil} \times EF \times \left( \frac{44}{28} \right) \quad \text{[Ecuación 35]}$$

Dónde el nitrógeno volátil se calcula según:

$$kgN_2O_{volatil}/vaca = 0,48 \times \frac{kgPV}{1000} \times EU \times \frac{Fracción_{volatil}}{100} \quad \text{[Ecuación 36]}$$

Dónde:

Fracción volátil = Porcentaje de nitrógeno que se volatiliza en forma de amoniaco. Se considera el 35% para climas templados cuando el estiércol se almacena sin cubierta.

### III.8. Estimación de la emisión de N<sub>2</sub>O producida por la gestión del suelo

Además de las emisiones de N<sub>2</sub>O que provienen de la gestión del estiércol, es necesario considerar también las emisiones producidas por la gestión del suelo tras el uso de fertilizante y el estiércol, el cambio de cultivo y la presencia de residuos agrícolas, se considera también el N<sub>2</sub>O de aportes de orina y estiércol de la tierra de pastoreo (IPCC, 2006).

$$N - N_2O_{DIRECTO} = N_{APORTES} + N_{SUELO\_ORGÁNICO} + N_{PASTOREO} \quad \text{[Ecuación 37]}$$

Dónde:

$$N_{APORTES} = (F_{SN} + F_{ON} + F_{CR} + F_{SOM}) \times EF_1 \quad \text{[Ecuación 38]}$$

$$N_{SUELO\_ORGÁNICO} = F_{OS} \times EF_2 \quad \text{[Ecuación 39]}$$

$$N_{PASTOREO} = F_{PRP} \times EF_3 \quad \text{[Ecuación 40]}$$

Dónde:

F<sub>SN</sub> = N producido a partir del uso de fertilizantes químicos (kg N/ año)

F<sub>ON</sub> = N del estiércol y purín aplicados como fertilizante (kg N/año)

F<sub>CR</sub> = N de los residuos de la cosecha anterior (kg N/año)

F<sub>SOM</sub> = N generado por el cambio de cultivos (kg N/año)

F<sub>OS</sub> = Superficie dedicada al cultivo (ha)

F<sub>PRP</sub> = N del estiércol de pastoreo (kg N/año)

EF<sub>1</sub> = Factor de emisión para emisiones de N<sub>2</sub>O. Se considera un valor de 0,01 kg N para los suelos agrícolas.

EF<sub>2</sub> = Factor de emisión para emisiones de N<sub>2</sub>O debido al drenaje de los suelos. Se considera un valor de 8 kg N/ha para suelos con pastos en clima templado.

EF<sub>3</sub> = Factor de emisión para emisiones de N<sub>2</sub>O del N de la orina y el estiércol depositado en pastos, prados y praderas por animales en pastoreo. Se considera un valor constante de 0,02 kg N para vacuno.

### III.9. Análisis estadísticos

Los resultados de ingestión de alimento, producción de leche y emisiones de metano entérico y N<sub>2</sub>O fueron analizados mediante un análisis de varianza mediante el paquete

estadístico R (R team core, 2014) considerando factores principales la dieta y la estación.

La comparación de medias de los resultados de metano entérico obtenido mediante el IPCC (2006) y la estimaciones por las diferentes modelos propuestos por *et al.* (2000), Mills *et al.* (2003) y Ellis *et al.* (2007) fue realizada mediante un test de medias pareadas.

## **RESULTADOS**



## IV. Resultados

### IV.1. Ingestión de las dietas

En la tabla IV.1 se muestra la ingestión de TMR, hierba, pienso, y el total de materia seca ingerida (MSI) así como la producción de leche (kg/d) según la estación y la dieta. Se observa que la ingestión de la TMR fue mayor en otoño que en primavera con 11,96 y 6,27 kg MS/d respectivamente ( $P < 0,001$ ) y fue también mayor ( $P < 0,001$ ) el consumo de dieta basada en ensilado de raigrás italiano (10,9 kg/d) que el consumo de dieta basada en ensilado de haba-colza (7,33 kg MS/d). Mientras, la ingestión de hierba no presentó diferencias significativas ni entre estaciones ni entre dietas, aunque el volumen consumido fue mayor en primavera con 14,5 kg MS/d que en otoño con 9,8 kg MS/d porque los animales tenían más acceso a la hierba fresca. La ingestión del pienso no presentó diferencia entre dietas, pero se observó una diferencia significativa entre estaciones con 1,9 y 2,5 kg MS/d en primavera y otoño, respectivamente ( $P < 0,01$ ). La producción de leche no se ve afectada ni por las dietas ni por estaciones.

Tabla IV.1. Ingestión de TMR, hierba, pienso y materia seca (MSI) y producción de leche según estación (E) y dieta (D)

Ingestión, kg MS/d	E		D		rsd	Significación		
	Primavera	Otoño	Alternativa	Convencional		D	E	D x E
TMR	6,3	12,0	7,3	10,9	2,86	***	***	**
Hierba	14,5	9,8	12,0	12,3	10,92	NS	NS	NS
Pienso	1,9	2,5	2,0	2,1	0,50	NS	**	NS
MSI <sup>1</sup>	22,6	24,3	21,4	25,5	9,50	NS	NS	NS
<b>Producción de leche, kg/d</b>	26,5	29,2	27,1	28,6	5,73	NS	NS	NS

<sup>1</sup> Incluye ingestión de mezcla, hierba y pienso suplementario durante el ordeño.

NS:  $P > 0,05$ ; \*\*:  $P < 0,01$ ; \*\*\*:  $P < 0,001$ .

La interacción entre dieta y estación observada en relación a la ingestión de TMR fue debida a qué, mientras en otoño no se mostraron diferencias entre dietas (11,50 vs. 12,42 kg MSI/d con las dietas alternativas y convencional respectivamente), en primavera la ingestión de TMR fue mayor ( $P < 0,001$ ) con la dieta convencional (9,38 kg MS/d) que con la dieta alternativa (3,15 kg MS/d).

## IV.2. Metano entérico

Las estimaciones de las emisiones de metano entérico (Tabla IV.2) fueron calculadas con las ecuaciones propuestas por el IPCC (2006) que se basan en la materia seca y la energía ingeridas. Se observa que las emisiones del metano por día a partir de la ingestión de la TMR fueron mayores en otoño que en primavera con 0,20 y 0,11 kg CH<sub>4</sub>/d, respectivamente ( $P < 0,001$ ). De la misma manera estas emisiones fueron mayores cuando los animales fueron alimentados con la dieta convencional con 0,19 frente a 0,13 kg CH<sub>4</sub>/d con la dieta alternativa ( $P < 0,001$ ).

Tabla IV.2. Estimación de las emisiones de metano entérico según la estación (E) y la dieta (D) expresadas por día, por kg de alimento ingerido y por kg de leche producida

Producción de metano	E		D		rsd	Significación		
	Primavera	Otoño	Convencional	Alternativa		D	E	D x E
<b>kg CH<sub>4</sub>/d</b>								
TMR	0,113	0,203	0,190	0,127	0,0493	***	***	**
Hierba	0,252	0,173	0,216	0,208	0,1893	NS	NS	NS
Pienso	0,013	0,017	0,015	0,014	0,0035	NS	***	NS
MSI <sup>1</sup>	0,378	0,393	0,421	0,349	0,1643	NS	NS	NS
<b>g CH<sub>4</sub>/ kg MS</b>								
TMR	18,05	17,01	17,54	17,52	0,467	NS	***	*
Hierba	15,50	12,56	17,54	17,54	7,280	NS	NS	NS
Pienso	6,82	6,69	6,75	6,76	0,139	NS	**	NS
MSI <sup>1</sup>	16,36	16,16	16,41	16,11	0,745	NS	NS	NS
<b>g CH<sub>4</sub>/kg leche</b>	14,72	13,68	15,15	13,25	6,358	NS	NS	NS

<sup>1</sup> Incluye ingestión de mezcla, hierba y piensos suplementarios durante el ordeño.

NS:  $P > 0,05$ ; \*:  $P < 0,05$ ; \*\*:  $P < 0,01$ ; \*\*\*:  $P < 0,001$ .

Las emisiones derivadas del consumo de hierba (0,21 kg/d) no presentaron diferencias significativas ni entre estaciones, ni entre dietas. Con el consumo de pienso, las emisiones fueron mayores en otoño con 0,02 frente a 0,01 kg CH<sub>4</sub>/d en primavera ( $P < 0,001$ ) pero no presentaron diferencias significativas entre dietas. Considerando el total de la ingestión de materia seca, se observó que no hubo diferencia ni entre estación ni entre dietas en las emisiones diarias de metano entérico.

Cuando las emisiones se expresaron por kg de MS ingerida, se observa que tras la ingestión de TMR no presentan diferencia entre dietas, pero sí entre estaciones, siendo mayor la producción de metano en primavera con 18,05 g CH<sub>4</sub>/ kg MS que en otoño con 17,01 g CH<sub>4</sub>/ kg MS ( $P < 0,001$ ). Las emisiones derivadas por kg de hierba ingerida, no mostraron diferencias con ningún de los dos factores en estudio, mientras que sí hubo diferencia entre estaciones debida al consumo de pienso, con emisiones mayores en primavera con 6,82 frente a 6,69 g CH<sub>4</sub>/kg MS en otoño ( $P < 0,01$ ). No se observaron diferencias ni entre dietas ni entre estaciones cuando se consideraron las emisiones de metano entérico por kg de materia seca ingerida total.

Asimismo, cuando se expresan las emisiones diarias totales en función de los kg de leche producidos, las emisiones de metano no presentaron ninguna diferencia ni entre estaciones y ni entre dietas.

La interacción entre dieta y estación en la producción de metano a partir de la ingestión de TMR se muestra en la tabla IV.3. Al igual que ocurre con la ingestión de TMR, mientras que en otoño no se presentaron diferencias entre dietas, en primavera, además de ser inferiores a las de otoño ( $P < 0,001$ ), estas fueron mayores con la dieta convencional que con la dieta de ensilado de haba y colza (0,17 vs. 0,06 kg CH<sub>4</sub>/d, respectivamente,  $P < 0,001$ ).

Tabla IV.3. Estimación de la emisión de metano según la dieta (D) ofertada en cada estación (E)

	Primavera		Otoño		rsd	Significación		
	Alternativa	Convencional	Alternativa	Convencional		D	E	D x E
kg/día	0,056 <sup>c</sup>	0,171 <sup>b</sup>	0,198 <sup>a</sup>	0,209 <sup>a</sup>	0,049	***	***	**
g/kg MS	17,85 <sup>b</sup>	18,24 <sup>a</sup>	17,18 <sup>b</sup>	16,84 <sup>c</sup>	0,467	NS	***	*

Letras diferentes en cada fila indican diferencias significativas entre los valores estimados.

NS:  $P > 0,05$ ; \*:  $P < 0,05$ ; \*\*:  $P < 0,01$ ; \*\*\*:  $P < 0,001$ .

Cuando las emisiones se expresan en g CH<sub>4</sub>/kg MS se observa que no hay diferencias entre estaciones con la dieta alternativa. Ahora bien, con la dieta convencional las emisiones de metano entérico fueron mayores en primavera que en otoño ( $P < 0,001$ ).

Además con la dieta convencional las emisiones en primavera resultaron mayores que con la dieta alternativa mientras que en otoño los resultados fueron menores.

### IV.3. Estimaciones de gases debidas a la gestión del estiércol

#### IV.3.1. Metano

La tabla IV.4 presenta las emisiones de metano a partir del estiércol excretado por los animales. Estas fueron mayores a partir del consumo de TMR en otoño que en primavera con 0,09 y 0,05 kg CH<sub>4</sub>/d respectivamente ( $P < 0,001$ ). Asimismo, las emisiones generadas a partir las excretas derivadas de las ingestiones de TMR con ensilado de raigrás fueron mayores que las derivadas por el consumo de ensilado de haba-colza (0,08 vs. 0,005 kg CH<sub>4</sub>/d respectivamente,  $P < 0,001$ ). Como en los casos anteriores, la interacción observada dieta x estación es debida a qué mientras con la dieta convencional no hubo diferencia entre estaciones, en primavera fueron menores con la dieta alternativa que con la convencional, como consecuencia de las diferencias de ingestión y por tanto de excreción de heces y orina. Las emisiones generadas a partir las excretas derivadas de las ingestiones de hierba, pienso así como del total de la MSI, no presentaron ninguna diferencia ni entre dietas ni entre estaciones.

Tabla IV.4. Estimaciones de las emisiones de metano a partir del estiércol

kg CH <sub>4</sub> /d	Estación		Dieta		rsd	Significación		
	Primavera	Otoño	Convencional	Alternativa		D	E	D x E
TMR	0,05	0,09	0,08	0,05	0,021	***	***	**
Hierba	0,11	0,07	0,09	0,09	0,081	NS	NS	NS
Pienso	0,01	0,01	0,01	0,01	0,001	NS	NS	NS
MSI <sup>1</sup>	0,17	0,17	0,18	0,15	0,070	NS	NS	NS

<sup>1</sup> Incluye ingestión de mezcla, hierba y pienso suplementario durante el ordeño.

NS:  $P > 0,05$ ; \*\*:  $P < 0,01$ ; \*\*\*:  $P < 0,001$ .

#### IV.3.2. Óxido nitroso

Las emisiones directas del óxido de nitroso provenientes del estiércol producido por los animales expresadas en kg N<sub>2</sub>O/d, como figuran en la tabla IV.5 no presentaron diferencias ni entre estaciones, ni entre dietas. De la misma manera, las emisiones

indirectas generadas por la volatilización de N en la atmósfera no presentaron diferencias ni con la ingestión de ensilado de raigrás italiano ni con el ensilado de haba-colza, independientemente de la estación. Por lo tanto, las emisiones de N<sub>2</sub>O tampoco mostraron diferencias estadísticas.

Tabla IV.5. Estimaciones de las emisiones de N<sub>2</sub>O directas e indirectas a partir del estiércol

Emisiones	Estación		Dieta		rsd	Significación		
	Primavera	Otoño	Convencional	Alternativa		D	E	D x E
<b>kg N<sub>2</sub>O/d</b>								
Directas	11•10 <sup>-4</sup>	12•10 <sup>-4</sup>	12•10 <sup>-4</sup>	11•10 <sup>-4</sup>	2•10 <sup>-4</sup>	NS	NS	NS
Indirectas	4•10 <sup>-4</sup>	4•10 <sup>-4</sup>	4•10 <sup>-4</sup>	4•10 <sup>-4</sup>	4,69•10 <sup>-5</sup>	NS	NS	NS
Totales	15•10 <sup>-4</sup>	16•10 <sup>-4</sup>	16•10 <sup>-4</sup>	15•10 <sup>-4</sup>	5•10 <sup>-4</sup>	NS	NS	NS

NS: P > 0,05.

#### IV.4. Emisiones de óxido de nitroso debidas a la gestión del suelo

En la tabla IV.6 se muestran que las emisiones de N<sub>2</sub>O generadas por la gestión del suelo debida a los cultivos forrajeros. Las emisiones debidas al uso de los fertilizantes (F<sub>SN</sub>), que incluye tanto las originadas por los fertilizantes orgánicos e inorgánicos y por los residuos de las cosechas, fueron mayores en el cultivo alternativo que en el cultivo convencional 3,65 vs. 2,70 kg N<sub>2</sub>O-N/año, respectivamente debido a que el cultivo generó más residuos tras la cosecha. Pero las perdidas debidas al drenaje en ambos cultivos (F<sub>OS</sub>) y al nitrógeno que proviene del estiércol de los animales en pastoreo (F<sub>PRP</sub>) fueron similares entre ambos manejos. Por lo tanto, las emisiones de N<sub>2</sub>O con el cultivo alternativo en la gestión del suelo fueron superiores a las del cultivo convencional.

Tabla IV.6. Estimaciones de las emisiones de N<sub>2</sub>O debidas a la gestión del suelo

kg N <sub>2</sub> O-N/año	F <sub>SN</sub>	F <sub>OS</sub>	F <sub>PRP</sub>	Total	Total (kg N <sub>2</sub> O /año)
<b>Convencional</b>	2,70	13,60	0,64	16,94	26,21
<b>Alternativa</b>	3,65	13,60	0,63	17,88	28,10

## IV.5. Global de emisiones

Para poder sumar el total de las emisiones generadas por el uso de una ración basada en ensilado de raigrás italiano o ensilado de haba-colza, las emisiones de metano entérico así como las de metano y nitroso originadas por el purín y el estiércol de los animales, se transformaron en kg de CO<sub>2</sub> eq por vaca y día aplicando los valores del potencial de calentamiento global del metano de 25 kg CO<sub>2</sub> eq/kg CH<sub>4</sub> y de 296 kg CO<sub>2</sub> eq/kg N<sub>2</sub>O (IPCC, 2006). Las emisiones totales expresadas como kg de CO<sub>2</sub>eq se muestran en la tabla IV.7.

Tabla IV.7. Estimación de las emisiones de metano entérico expresadas en CO<sub>2</sub>eq/d según la estación (E) y la dieta (D)

	E		D		rsd	Significación		
	Primavera	Otoño	Convencional	Alternativa		D	E	D x E
A partir del CH <sub>4</sub> entérico	9,44	9,82	10,53	8,74	4,10	NS	NS	NS
A partir del CH <sub>4</sub> de las excretas	4,11	4,31	4,60	3,82	1,771	NS	NS	NS
A partir del N <sub>2</sub> O de las excretas	0,458	0,461	0,463	0,456	0,0535	NS	NS	NS
Totales debidas al animal	14,01	14,59	15,59	13,02	4,467	NS	NS	NS
Totales debidas a los cultivos	-	-	21,58	22,79	-	-	-	-
<b>Totales</b>	-	-	37,17	35,81	-	-	-	-

NS: P > 0,05.

Las emisiones entéricas expresadas como kg CO<sub>2</sub> eq/ d no presentaron diferencias entre dietas ni estaciones. Asimismo, y debida a la falta de diferencias derivadas de las emisiones de CH<sub>4</sub> y N<sub>2</sub>O de las excretas, no se observaron diferencias en las emisiones debidas a las mismas. Por lo tanto, tampoco hay diferencias en las emisiones de gases de efecto invernadero debido al animal ni entre dietas ni entre estaciones. Ahora bien, numéricamente las emisiones de kg de CO<sub>2</sub> eq al día debidas al animal fueron un 16% mayores con la dieta convencional que con la dieta alternativa (15,6 vs. 13,0 kg CO<sub>2</sub> eq/d respectivamente). Las emisiones de CO<sub>2</sub> eq al día a partir de los cultivos fueron un 5% inferiores con el cultivo de raigrás italiano que con el cultivo haba-colza (21,6 vs. 22,8 kg CO<sub>2</sub> eq/d respectivamente).

Finalmente, adicionando las emisiones diarias debidas al cultivo con las emisiones animales podemos decir que la alimentación con una dieta basada en raigrás italiano se emiten 37,72 kg CO<sub>2</sub> eq/d incluyendo tanto el cultivo como las emisiones entericas y de excretas del animal, mientras que con una dieta basada en haba y colza forrajera las emisiones globales diarias se reducen a 35,8 kg CO<sub>2</sub> eq/d.

#### IV.6. Comparación de las diferentes ecuaciones de predicción de emisión de metano entérico con el modelo del IPCC

En la tabla IV.8, se muestra el valor estimado de las perdidas de metano entérico (expresadas en MJ/d) calculadas a partir de la MSI total según el modelo del IPCC (2006) y el propuesto por Yates *et al.* (2000) que se basa en la MSI y en la proporción de forraje. Se observa que ambos modelos no presentaron diferencias con las dietas usadas y tampoco con las estaciones. Ahora bien el modelo de Yates *et al.* (2000) obtuvo unas estimaciones de emisiones de metano entérico más altas que el modelo del IPCC, con 31,54 y 24,79 MJ/d respectivamente, ( $P < 0,001$ ). Sin embargo, ambas estimaciones estuvieron altamente correlacionadas ( $R^2 = 0,988$ ), lo que indica que el modelo de Yates *et al.* (2000) tiene un sesgo positivo respecto a las estimaciones del modelo del IPCC.

Tabla IV.8. Estimaciones de las emisiones de metano entérico según el IPCC y las ecuaciones de Yates *et al.* (2000)

MJ/d	Estación		Dieta		rsd	Significación		
	Primavera	Otoño	Convencional	Alternativa		D	E	D x E
IPCC <sup>1</sup>	24,25 <sup>a</sup>	25,33 <sup>a</sup>	27,03 <sup>a</sup>	22,56 <sup>a</sup>	10,24	NS	NS	NS
Yates <sup>2</sup>	33,06 <sup>b</sup>	30,03 <sup>b</sup>	32,77 <sup>b</sup>	30,33 <sup>b</sup>	11,83	NS	NS	NS

<sup>1</sup>: Ecuación 15, <sup>2</sup>: Ecuación 31.

NS:  $P > 0,05$ . Letra diferente en la misma columna indica diferencias significativas con  $P < 0,001$ .

Las ecuaciones de Mills *et al.* (2003) que figuran en la tabla IV.9 fueron calculadas según los diferentes parámetros que se describen en el capítulo de material y métodos.

Tabla IV.9. Estimaciones de las emisiones de metano según el IPCC y las ecuaciones de Mills *et al.* (2003)

MJ/d	Estación		Dieta		rsd	Significación		
	Primavera	Otoño	Convencional	Alternativa		D	E	D x E
IPCC <sup>1</sup>	24,25	25,33	27,03	22,56	10,24	NS	NS	NS
Mills 1 <sup>2</sup>	26,30	28,27	29,38	25,65	8,74	NS	NS	NS
Mills 2 <sup>3</sup>	23,93	25,31	26,00	23,25	6,57	NS	NS	NS
Mills 3 <sup>4</sup>	23,51	25,33	26,80	22,05	6,16	*	NS	NS
Mills 4 <sup>5</sup>	29,50	29,43	31,22	27,72	9,16	NS	NS	NS
Mills 5 <sup>6</sup>	25,07	27,21	27,76	24,52	7,50	NS	NS	NS
Mills 6 <sup>7</sup>	21,31	23,30	23,62	20,99	6,19	NS	NS	NS
Mills 7 <sup>8</sup>	25,25	28,32	27,61	25,95	7,94	NS	NS	NS

<sup>1</sup>: Ecuación 15, <sup>2</sup>: Ecuación 16, <sup>3</sup>: Ecuación 17, <sup>4</sup>: Ecuación 18, <sup>5</sup>: Ecuación 19, <sup>6</sup>: Ecuación 20, <sup>7</sup>: Ecuación 21

<sup>8</sup>: Ecuación 22. NS:  $P > 0,05$ ; \*:  $P < 0,05$ .

Se observa que las estimaciones con todos los modelos de Mills *et al.* (2003), tanto lineales (ecuaciones de 1 a 4) como cuadráticos (ecuaciones de 5 a 7) no mostraron diferencias entre estaciones y dietas, excepto la ecuación Mills 3, basada en la composición del alimento que mostró diferencias significativas entre dietas (26,80 vs. 22,05 MJ/d con la dieta convencional y con la dieta alternativa respectivamente,  $P < 0,05$ ). Esta diferencia encontrada probablemente es debida a que la desviación estándar entre medias por este modelo es menor a la encontrada aplicando el modelo del IPCC.

Los modelos lineales que se basan en la MSI (Mills 1), en la proporción de forraje y en la MSI (Mills 4) estimaron unas emisiones más altas, según la prueba t de medias emparejadas, que aquellas estimadas por el IPCC (27,51; 29,47 y 24,79 MJ/d respectivamente,  $P < 0,001$ ) (Tabla IV.10), mientras que los modelos que usaron la EM ingerida (Mills 2) y la composición del alimento (Mills 3) no presentaron diferencias entre los dos modelos. Si bien, el modelo basado en la EM ingerida (Mills 2) muestra una alta correlación entre las estimaciones de ambos modelos ( $R^2=0,99$ ), mientras que el modelo Mills 3 presenta una baja correlación ( $R^2=0,68$ ).

Cuando comparamos las estimaciones del IPCC con las ecuaciones cuadráticas propuestas por Mills *et al.* (2003) vemos que la ecuación Mills 5 calculada en función

de la MSI presentó unas pérdidas de metano entérico más altas que aquellas del IPCC (26,14 frente a 24,79 MJ/d,  $P < 0,01$ ). De la misma manera, la ecuación Mills 7 estimada con la EM y la composición del alimento dio unas emisiones de metano más altas que las del IPCC (26,78 MJ/d,  $P < 0,001$ ), si bien la correlación entre esta última y el IPCC es menor ( $R^2=0,88$ ) que con la anterior ( $R^2=0,98$ ). La ecuación Mills 6 basada solamente en la EM ingerida estimó unas emisiones más bajas con 22,30 frente a 24,79 MJ/d derivadas de las estimaciones del IPCC ( $P < 0,05$ ) y con elevada correlación entre ellas, lo que implicaría que subestimaría sistemáticamente la predicción de las estimaciones de metano utilizando el modelo cuadrático de Mills *et al.* (2003) basado en la EM ingerida.

Tabla IV.10. Comparación de las medias de emisiones de metano entérico (MJ/d) de las ecuaciones de Mills *et al.* (2003) con el modelo del IPCC (2006).

Ecuaciones	Media	R <sup>2</sup>	Significación
Mills 1	27,51 <sup>b</sup>	0,996	***
Mills 2	24,62 <sup>a</sup>	0,991	NS
Mills 3	24,42 <sup>a</sup>	0,676	NS
Mills 4	29,47 <sup>b</sup>	0,993	***
Mills 5	26,14 <sup>b</sup>	0,981	**
Mills 6	22,30 <sup>b</sup>	0,976	*
Mills 7	26,78 <sup>b</sup>	0,880	***
IPCC	24,79 <sup>a</sup>	-	-

Letras diferentes en la misma columna indica diferencias significativas con el valor del IPCC.

NS:  $P > 0,05$ ; \*:  $P < 0,05$ ; \*\*:  $P < 0,01$ ; \*\*\*:  $P < 0,001$ .

En la tabla IV.11 se muestra los resultados de los modelos de Ellis *et al.* (2007) basándose también en los varios parámetros descritos en el capítulo de materiales y métodos y su comparación con el modelo propuesto por el IPCC. Igual que en el caso anterior y con las estimaciones del IPCC, los modelos de Ellis *et al.* (2007) no muestran diferencias entre dietas y estaciones, excepto el modelo que considera la proporción de forraje en la ración, que presentó una mayor producción de metano en la primavera con 20,39 frente a 18,34 MJ/d en otoño ( $P < 0,001$ ). Esta diferencia puede ser debida también a la baja desviación estándar entre las medias calculadas.

Tabla IV.11. Estimaciones de las emisiones de metano según el IPCC y las ecuaciones de Ellis *et al.* (2007)

MJ/d	Estación		Dieta		rsd	Significación		
	Primavera	Otoño	Convencional	Alternativa		D	E	D x E
IPCC <sup>1</sup>	24,25	25,33	27,03	22,56	10,24	NS	NS	NS
Ellis 1 <sup>2</sup>	21,55	22,73	23,58	20,70	7,68	NS	NS	NS
Ellis 2 <sup>3</sup>	20,39	18,34	19,32	19,41	1,46	NS	***	NS
Ellis 3 <sup>4</sup>	19,27	20,43	20,99	18,71	6,36	NS	NS	NS
Ellis 4 <sup>5</sup>	27,48	27,32	29,32	25,49	10,62	NS	NS	NS
Ellis 5 <sup>6</sup>	20,51	21,37	22,32	19,56	5,60	NS	NS	NS
Ellis 6 <sup>7</sup>	22,27	21,91	23,05	21,12	6,31	NS	NS	NS
Ellis 7 <sup>8</sup>	27,24	27,81	29,51	25,54	10,98	NS	NS	NS
Ellis 8 <sup>9</sup>	27,86	27,95	29,80	26,01	11,51	NS	NS	NS

<sup>1</sup>: Ecuación 15, <sup>2</sup>: Ecuación 23, <sup>3</sup>: Ecuación 24, <sup>4</sup>: Ecuación 25, <sup>5</sup>: Ecuación 26, <sup>6</sup>: Ecuación 27, <sup>7</sup>: Ecuación 28,

<sup>8</sup>: Ecuación 29, <sup>9</sup>: Ecuación 30. NS:  $P > 0,05$ ; \*\*\*:  $P < 0,001$

En la tabla IV.12 se muestra la comparación de medias de las emisiones estimadas por el IPCC y las diferentes ecuaciones propuestas por Ellis *et al.* (2007). Las ecuaciones que usan la FND (Ellis 4), EM y FND (Ellis 7) y MSI, FAD y FND (Ellis 8) no presentaron diferencias significativas comparando con las estimaciones del IPCC, aunque sus valores fueron numéricamente superiores. Sin embargo, las ecuaciones basadas en la MSI (Ellis 1), la proporción de forraje (Ellis 2), la EM ingerida (Ellis 3), la FAD (Ellis 5) y considerado la EM ingerida y la proporción de forraje (Ellis 6) presentaron valores más bajos comparando sus estimaciones con el modelo del IPCC, 24,79 MJ/d, (Ellis 1: 22,14 MJ/d,  $P < 0,01$ ; Ellis 2: 19,36 MJ/d,  $P < 0,001$ ; Ellis 3: 19,32 MJ/d,  $P < 0,001$ ; Ellis 5: 20,33 MJ/d,  $P < 0,001$  y Ellis 6: 21,50 MJ/d,  $P < 0,01$ ). Además, las estimas realizadas con ambos modelos presentan bajas correlación entre sí. Así la ecuación que se basa en la MSI muestra la correlación más alta ( $R^2=0,84$ ) y la basada en la proporción de forraje la más baja ( $R^2=0,43$ ). Por lo tanto, comparando con las estimaciones del IPCC, usar estas ecuaciones para estimar las emisiones de metano entérico subestimaría los valores de emisión y además con una escasa precisión.

Tabla IV.12. Comparación de las medias de emisiones de metano entérico (MJ/d) de las ecuaciones de Ellis *et al.* (2007) con el modelo del IPCC (2006).

Ecuaciones	Media	R <sup>2</sup>	Significación
Ellis 1	22,14 <sup>b</sup>	0,842	**
Ellis 2	19,36 <sup>b</sup>	0,430	***
Ellis 3	19,32 <sup>b</sup>	0,709	***
Ellis 4	26,58 <sup>a</sup>	0,737	NS
Ellis 5	20,33 <sup>b</sup>	0,673	***
Ellis 6	21,50 <sup>b</sup>	0,670	**
Ellis 7	26,72 <sup>a</sup>	0,745	NS
Ellis 8	27,09 <sup>a</sup>	0,744	NS
IPCC	24,79 <sup>a</sup>	-	-

Letras diferentes en la misma columna indica diferencias significativas con el valor del IPCC.

NS: P > 0,05; \*: P < 0, 05; \*\*: P < 0, 01; \*\*\*: P < 0,001.



## **DISCUSIÓN**



## V. Discusión

La ingestión de la TMR fue sensiblemente mayor con la dieta convencional que con la dieta alternativa en el ensayo de primavera. La baja ingestión de TMR con la dieta alternativa en primavera puede ser debida al hecho que la colza contiene glucosinolatos que reducen la ingestión del alimento. Estos compuestos no son tóxicos por si mismos, pero la acción de la enzima Myrosinase presente en la colza, los transforma en isothiocyanatos responsables directos de la disminución de la ingestión de la dieta (Agnihotri, 2010). Ahora bien, cabe destacar que las variedades de colza forrajera actualmente ya están libres de estos componentes. Además, los glucosinolatos se concentran principalmente en el grano, mientras que en los ensayos de alimentación se uso la planta entera, quedando por lo tanto dichos efectos diluidos. Por otra parte, hay que considerar que en otoño no se observaron diferencias entre dietas tratándose de los mismos ingredientes. Esta diferencia entre estación en la ingestión de TMR podría explicarse por el mayor consumo de hierba en el ensayo de primavera, aunque sin diferencia estadísticas en el otoño. Esta mayor ingestión podría ser debida a que la hierba en primavera tenía una calidad nutricional más alta y una palatabilidad mayor que la hierba disponible en otoño.

Como el modelo de calculo de las emisiones de metano entérico propuestas por el IPCC (2006) esta basado en la ingestión de materia seca y energía, los resultados obtenidos están en consonancia con las ingestiones medidas.

Las estimaciones de las emisiones de metano entérico fueron mayores que los valores estimados por el mismo procedimiento por Lagesse *et al.* (2011) para vacuno de carne en pastoreo o aquellos estimados a partir de las cámaras respiratorias por Brask *et al.* (2013), mientras que Velarde-Guillén *et al.* (2015) en vacas en lactación con dietas de maíz, y aplicando también el modelo del IPCC (2006), obtuvieron estimaciones cercanas a las calculadas en el presente trabajo. Como los estudios de Lagesse *et al.* (2011) y Brask *et al.* (2013) utilizaron una proporción de forraje inferior a 60% y Velarde-Guillén *et al.* (2015) tenía un ratio forraje: concentrado de 79:21, y las dietas utilizadas en este estudio tenían un 78% de forraje, se confirma que una alta proporción de forraje puede inducir a unas emisiones de metano entérico más altas. Este efecto del forraje esta en coincidencia con el estudio de Aguerre *et al.* (2011) donde se observó un

incremento de las emisiones de CH<sub>4</sub> entérico en vacas lecheras de 0,538 a 0,648 kg por vaca y día al aumentar de 47% a 68% la proporción de forraje en la dieta.

Las emisiones de metano a partir del estiércol no presentaron valores altos considerando la materia seca ingerida total en comparación con la bibliografía. De la misma manera que las emisiones de óxido de nitroso generadas por la gestión del estiércol no fueron diferentes ni entre dietas ni entre estaciones. El CH<sub>4</sub> se produce durante la descomposición anaeróbica del estiércol, mientras que N<sub>2</sub>O se produce directamente a través de los procesos de nitrificación y desnitrificación del estiércol e indirectamente por la volatilización y lixiviación del N del estiércol. Aunque las emisiones de GEI originadas por los animales en pastoreo se pueden considerar como no elevados, hay que considerar la compensación que se produciría por los prados y praderas de pastoreo que actúan como sumideros de CO<sub>2</sub>.

Las emisiones de óxido de nitroso debidas a la gestión del suelo fueron mayores con el cultivo de haba y colza por el hecho que los residuos de la cosecha de las leguminosas son mayores que los residuos generados por el cultivo de praderas de gramíneas (IPCC 2006).

Considerando las emisiones globales de los cultivos vemos, por lo tanto, que las emisiones son superiores en el cultivo alternativo que en el convencional. Este hecho, constituye un problema inicial para una posible sustitución del cultivo de invierno en la rotación maíz-raigrás italiano. Pero, el uso de la alternativa de leguminosa-crucífera en la dieta de los animales, reduce de un modo importante las emisiones de metano entérico y del metano y el óxido de nitroso de las excretas que compensaría la mayor emisión de su cultivo.

La ecuación propuesta por Yates *et al.* (2000) está basada en la materia seca ingerida, la proporción de concentrado y la concentración de FND en la dieta. El valor de emisión de metano entérico así calculado es más alto que el estimado por el IPCC (2006). Esto se puede explicar por el hecho de que el modelo del IPCC no considera la proporción de forraje o de concentrado, en la dieta y se basa especialmente en la EB ingerida y que el modelo de Yates sustrae el efecto de la proporción de concentrado a favor de la

proporción de forraje consumido por el animal, lo que daría unas estimaciones de metano entérico más altas y cuando el ratio forraje: concentrado sea mayor.

Las emisiones de metano entérico estimadas con la ecuación lineal de Mills *et al.* (2003) que se basa en la EM ingerida (Mills 2) y la que se basa en la composición del alimento (Mills 3) no presentaron diferencias con los resultados dados por el IPCC (2006). El hecho de que estas dos ecuaciones consideren parámetros asimilables a los del IPCC puede ser la razón de no apreciar diferencias entre ellas. Ahora bien, la ecuación lineal que considera únicamente la MSI (Mills 1) y la que se basa en ambas MSI y proporción de forraje (Mills 4) presentaron diferencias significativas con la ecuación del IPCC.

Las razones de estas diferencias de estimación son similares a las anteriormente expuestas con la ecuación de Yates *et al.* (2000). La elevada proporción de forraje es la razón de los resultados de altas emisiones de metano entérico. También se ve que cuando la MSI aumenta, por ejemplo en otoño, las emisiones de metano suben independientemente del modelo usado. Este incremento en las emisiones se mantiene con la ecuación cuadrática de Mills *et al.* (2003) que las estiman en función de la MSI (Mills 5). Ahora bien, a pesar de las diferencias encontradas, la correlación entre las estimaciones del IPCC (2006) y las ecuaciones propuestas por Mills *et al.* (2003) es elevada, lo que las valida a efectos comparativos, ya que el sesgo que presenten ambas estimaciones está en la misma dirección independientemente de la dieta, la época o el animal.

Las ecuaciones de Ellis *et al.* (2007) que se basan en la MSI (Ellis 1), en la proporción de forraje de la ración (Ellis 2) o la EM ingerida (Ellis 3) subestiman las emisiones de metano comparado las con el modelo del IPCC (2006), y por tanto también, las estimaciones de Mills *et al.* (2003). Este hecho es coincidente con otros autores (Lagesse *et al.*, 2011), dónde el modelo predictivo de Ellis *et al.* (2007) reportó las estimaciones más bajas en comparación con el modelo del IPCC (2006) y con otros modelos mecanísticos aplicados. Además, los coeficientes de correlación calculados entre ambos modelos son moderadamente bajos, por lo que la precisión de la medida con el modelo de Ellis *et al.* (2007) es baja en comparación con la de Mills *et al.* (2003) considerando como referencia las predicciones del IPCC (2006).



## **CONCLUSIONES**



## VI. Conclusiones

A partir de los resultados obtenidos en el presente trabajo en el que se estimó las emisiones de gases de efecto invernadero basándose en el modelo propuesto por el IPCC (2006) en vacas Holstein en pastoreo alimentadas con raciones basadas en ensilado de raigrás italiano o con ensilado del inter-cultivo de haba y colza forrajera se puede concluir que:

1. Usando el modelo del IPCC (2006) no hay diferencia ni entre dietas ni entre estaciones cuando se considera la materia seca ingerida total. Cuando se considera exclusivamente el consumo de TMR la ración formulada con el ensilado de haba y colza presentó una emisión de metano entérico menor que la ración con raigrás italiano, especialmente debido a la menor ingestión de materia seca en primavera.
2. Si consideramos los resultados obtenidos con el IPCC (2006) como referencia, se puede decir que las ecuaciones de propuestas por Mills *et al.* (2003) presentaron unas estimaciones de las emisiones de metano entérico aceptables, especialmente la ecuación lineal basada en la EM, con una estimación coincidente con el modelo del IPCC (2006) y una correlación superior a 0,99. El hecho de que las diferencias de predicción de las emisiones de CH<sub>4</sub> entérico entre el IPCC (2006) y Ellis *et al.* (2007) sean menores y Yates *et al.* (2000) sean mayores limitan su uso a efectos comparativos.



## **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**



## VII. Referencias bibliográficas

- ADAS. 1985. Compound feed evaluation for the ruminants. Technical Bulletin 85/21. Ministry of Agricultural, Fisheries and Food. Reading, UK. pp. 2.
- AFRC. 1993. Energy and protein requirements of ruminants. Agricultural and Food Research Council. CAB International, Wallingford, UK.
- Agarwal, N., Shekhar, C., Kumar, R., Chaudhary, L.C. and Kamra D.N. 2009. Effect of peppermint (*Mentha piperita*) oil on in vitro methanogenesis and fermentation of feed with buffalo rumen liquor. *Animal Feed Science and Technology*, 148: 321-327.
- Agnihotri, A. 2010. Synergy of biotechnological approaches with conventional breeding to improve quality of rapeseed-mustard oil and meal. *Animal Nutrition and Feed Technology*, 10S: 169-177.
- Aguerre, M.J., Wattiaux, M.A., Powell, J.M., Broderick, G.A. and Arndt, C. 2011. Effect of forage-to-concentrate ratio in dairy cow diets on emission of methane, carbon dioxide, and ammonia, lactation performance, and manure excretion. *Journal of Dairy Science* 94: 3081-3093.
- Anderson, R. C. and Rasmussen, M. A. 1998. Use of a novel nitrotoxin metabolizing bacterium to reduce ruminal methane production. *Bioresource Technology* 64: 89-95.
- AOAC. 1984. Official Methods for Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 14<sup>th</sup> edition. Arlington, VA, 1141 pp.
- Ashes, J.R., Gulati, S.K. and Scott, T.W. 1997. New approaches to changing milk composition: Potential to alter the content and composition of milk fat through nutrition. *J. Dairy Sci.*, 80: 2204-2212.
- Beauchemin, K. A., McGinn, S. M., Martinez, T. F. and McAllister, T. A. 2007. Use of condensed tannin extract from quebracho trees to reduce methane emissions from cattle. *J. Anim Sci.*, 85: 1990-1996
- Beauchemin, K. A., Kreuzer, M., O'Mara, F. and McAllister, T. A., 2008. Nutritional management for enteric methane abatement: a review. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 48: 21-27.
- Becker, M. and Nehring, K. 1967. *Handbuch der Futtermittel* vol 3. Parey. Verlag, Hamburg.

- Beever, D.E., Thomson, D.J., Ulyatt, M.J., Cammell, S.B. and Spooner, M.C. 1985. The digestion of fresh perennial ryegrass (*Lolium perenne* L. cv. Melle) and white clover (*Trifolium repens* L. cv. Blanca) by growing cattle fed indoors. *British Journal of Nutrition* 54: 763-775.
- Benchaar, C., Pomar, C. and Chiquette, J. 2001. Evaluation of dietary strategies to reduce methane production in ruminants: A modelling approach. *Canadian Journal of Animal Science* 81: 563-574.
- Bindoff, N.L., Willebrand, J., Artale, V., Cazenave, A., Gregory, J., Gulev, S., Hanawa, K., Le Quéré, C., Levitus, S., Nojiri, Y., Shum, C.K., Talley L.D. and Unnikrishnan, A. 2007. Observations: Oceanic Climate Change and Sea Level. In: *Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel of Climate Change* (Solomon, S., Qin, D., Manning, M., Chen, Z., Marquis M., Averyt., K.B., Tignor, M. and Millert, H.L. (eds)). Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA.
- Blas, C., Garcia-Rebollar, P., Cambra-López, M. and Torres, A.G. 2008. Contribución de los rumiantes a las emisiones de gases con efecto invernadero, XXIV curso de especialización FEDNA, Madrid.
- Blaxter, K.L. and Clapperton, J.L. 1965. Prediction of the amount of methane produced by ruminants. *British Journal of Nutrition* 19: 511-522.
- Blümmel, M., Givens, D.I. and Moss, A.R. 2005. Comparaison of methane produced by straw fed sheep in open-circuit respiration with methane predicted by fermentation characteristics measured by an in vitro gas procedure. *Animal Feed Science and Technology* 123-124: 379-390.
- Boadi, D. A. and Wittenberg, K. M. 2002. Methane production from dairy and beef heifers fed forages differing in nutrient density using the sulphur hexafluoride (SF<sub>6</sub>) tracer gas technique. *Canadian Journal of Animal Science* 82: 201-206.
- Brask, M., Lund, P., Hellwing, A.L.F., Poulsen, M. and Weisbjerg, M.R. 2013. Enteric methane production, digestibility and rumen fermentation in dairy cows fed different forages with and without rapeseed fat supplementation. *Animal Feed Science and Technology* 184: 67-79.
- Bratzl, J.W. and Forbea, F.B. 1940. The estimation of methane production by cattle. *Journal of Nutrition* 19: 611-613.

- Broudiscou, L-P., Papon, Y. and Broudiscou, A.F. 2000. Effects of dry plant extracts on fermentation and methanogenesis in continuous culture of rumen microbes. *Animal Feed Science and Technology* 87: 263-277.
- Cambra-López, M., Garcia Rebollar, M., Estellés, F. and Torres, A. 2008. Estimación de las emisiones de los rumiantes en España: El factor de conversión de metano. *Archivos de zootecnia* vol.57(R): 89-101.
- Chagunda, M. G. G., Flokhar, J. F. and Roberts, D. J. 2010. The effect of forage quality on predicted enteric methane production from dairy cows. *International Journal of Agricultural Sustainability* 8 (4): 250-256.
- Chandramoni, Jadhao, S.B., Tiwari, C.M. and Khan, M.Y. 2000. Energy metabolism with particular reference to methane production in Muzzaffarnagari sheep fed rations varying in roughage to concentrate ratio. *Animal Feed Science and Technology* 83: 287-300.
- Carulla, J.E., Kreuzer, M., Machmüller, A. and Hess, H.D. 2005. Supplementation of *Acacia Mearnsii* tannin decreases methanogenesis and urinary nitrogen in forage-fed sheep. *Australian Journal of Agricultural Research* 56: 961-970.
- Chaves, A.V., Thompson, L.C., Iwaasa, A.D., Scott, S.L., Olson, M. E., Benchaar, C., Veira, D. M. and McAllister, T. A. 2006. Effect of pasture type (alfalfa vs. grass) on methane and carbon dioxide production by yearling beef heifers. *Canadian journal of animal science* 86; 409-418.
- Chen, M. and Wolin, M.J. 1979. Effect of Monensin and Lasalocid-sodium on the growth of methanogenic and rumen saccharolytic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 38: 72-77.
- Chenost, M. and Kayouli, C. 1997. Utilisation des fourrages grossiers en régions chaudes. FAO- Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture, Rome. *Production et santé animale*, 135.
- Chynoweth, D. P. 1996. Environmental impact of biomethanogenesis. *Environmental Monitoring and Assessment* 42: 3-18.
- De Klein, C.A.M., Pinares-Patiño, C. and Waghorn, G.C. 2008. Greenhouse gas emissions. In : *Environmental impacts of pasture-based farming*. McDowell RW. CAB International. London. UK. pp.1-32.
- Demeyer, D. and Fievez, V. 2000. Ruminants et environnement : la méthanogène. *Annales de Zootechnie* 49: 95-112.

- DeRamus, A.H., Clement, T.C., Giampola, D.D. and Dickison, P.C. 2003. Methane emissions of beef cattle on forages: Efficiency of grazing management systems. *Journal of Environmental Quality* 32: 269-277.
- Dohme, F., Machmüller, A., Wasserfallen, A. and Kreuzer, M. 2000. Comparative efficiency of various fats rich in medium-chain fatty acids to suppress ruminal methanogenesis as measured with RUSITEC. *Canadian Journal of Animal Science* 80:473-482.
- Dong, Y., Bae, H. D., McAllister, T.A., Mathison, G.W. and Cheng, K.J. 1997a. Lipid-induced depression of methane production and digestibility in the artificial rumen system (RUSITEC). *Canadian Journal of Animal Science* 77: 269-278.
- Dong, Y., Bae, H. D., McAllister, T.A., Mathison, G.W. and Cheng, K.J. 1997b. Effects of exogenous fibrolytic enzymes, abromoethanesulfonate and monensin on fermentation in a rumen simulation (RUSITEC) system. *Canadian Journal of Animal Science* 79: 491-498.
- Eckard, R.J., Grainger, C.J and De Klein, C.A.M. 2010. Options for the abatement of methane and nitrous oxide from ruminant production-a review. *Livestock Science* 130: 47-56.
- Ellis, J.L., Kebreab, E., Odongo, N.E., McBride, B.W., Okine, E.K. and France, J. 2007. Prediction of methane production from dairy and beef cattle. *Journal of Dairy Science* 90: 3456-3467.
- Ellis, J.L., Dijkstra, J., France, J., Parsons, A.J., Edwards, G.R., Rasmussen, S., Kebreab E. and Bannink, A. 2012. Evaluation of high-sugar grasses on methane emissions simulated using a dynamic model. *Journal of Dairy Science* 95: 272-285.
- Fernández, C., López M.C. and Lachica, M. 2012. Description and function of a mobile open-circuit respirometry system to measure gas exchange in small ruminants. *Animal Feed Science and Technology* 172: 242-246.
- Folland, C. K., Karl, T. R., Christy, J. R., Clarke, R. A., Gruza, G. V., Jouzel, J., Mann, M.E., Oerlemans, J., Salinger M. J. and Wang, S. W. 2001. Observed Climate Variability and Change. In: J.T. Houghton, Y. Ding, D.J. Griggs, M. Noguer, P.J. van der Linden, X. Dai, K. Maskell, and C.A. Johnson (eds.) *Climate Change 2001: The Scientific Basis. Contribution of Working Group I to the Third Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge, UK, and New York, NY: Cambridge University Press.

- Frumholtz, P.P., Newbold., C.J. and Wallace, R.J. 1989. Influence of *Apergillus oryzae* fermentation extracto on the fermentation extracto f a basal ration in the rumen simulation technique (Rusitec). *Journal of Agriculture Science (Cambridge)* 113: 169-172.
- Gerber, P., Vellinga, T., Opio, C., Henderson, B. and Steinfeld, H. 2010. Greenhouse gas emissions from the dairy sector - a life cycle assessment. Food and Agriculture Organisation of the United Nations, Animal Production and Health Division, Rome.
- Grainger, C., Clarke, T., McGinn, S.M., Auldist, M.J., Beauchemin, K.A., Hannah, M.C., Waghorn, G.C., Clark, H. and Eckard, R.J. 2007. Methane Emissions from Dairy Cows Measured Using the Sulfur Hexafluoride (SF<sub>6</sub>) Tracer and Chamber Techniques. *Journal of Dairy Science* 90: 2755-2766.
- Hagemann, M., Ndambi, A., Hemme, T. and Latacz-Lohmann, U. 2012. Contribution of milk production to global greenhouse gas emissions - an estimation based on typical farms. *Environmental Science and Pollution Research* 19: 390-402.
- Hammer, K.A., Carson, C.F. and Riley, T.V. 1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology* 86: 985-990.
- Hess, H.D., Beuret, R.A., Lötscher, M., Hindrichsen, I.K., Machmüller, A., Carulla, J.E., Lascano, C.E. and Kreuzer, M. 2004. Ruminant fermentation, methanogenesis and nitrogen utilization of sheep receiving tropical grass hay-concentrate diets offered with *Sapindus saponaria* fruits and *Cratylia argentea* foliage. *Animal Science* 79:177-189.
- Hristov, A.N., Hanigan, M., Cole, A., Todd, R., McAllister T.A., Ndegwa P.M. and Rotz, A. 2011. Ammonia emissions from dairy farms and beef feedlots: a review. *Canadian Journal of Animal Science* 91: 1-35.
- Hristov, A.N. 2013. Diet formulation as an effective tool for mitigating nitrogen excretion in dairy system. *Advances in Animal Biosciences* 4: 15-18.
- Immig, I., Fielder, D., Van Nevel, C. and Demeyer, D. 1995. Inhibition of methanogenesis in the rumen of a sheep with BES. *Proceedings of the Society of Nutrition Physiology* 4: 68-75.
- IPCC. 2006. IPCC guidelines for National Greenhouse Gas Inventories. Vol. 4: Agricultural, Forestry and Other Land Use. IGES, Kanagawa, Japan.
- IPCC. 2007. Cambio climático 2007: Informe de síntesis. IPCC, Ginebra, Suiza.

- IPCC, 2014: Climate Change 2014: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [Core Writing Team, R.K. Pachauri and L.A. Meyer (eds.)]. IPCC, Geneva, Switzerland, pp 151.
- Jarrell, K.F., Bayley, D.P., Correia, J.D. and Thomas, N.A. 1999. Recent excitement about the Archaea. *Bioscience* 49: 530-541.
- Johnson, K., Huyler, M., Westberg, H., Lamb, B. and Zimmerman, P. 1994. Measurement of methane emissions from ruminant livestock using a sulfur hexafluoride tracer technique. *Environmental Science and Technology* 28: 359-362.
- Johnson, K. A. and Johnson, D. E. 1995. Methane emissions from cattle. *Journal of Animal Science* 73: 2483-2492.
- Johnson, D.E., Ward, G.W. and Ramsey, J.J. 1996. Livestock methane: Current emissions and mitigation Potential. In E.T Kornegay, ed. *Nutrient management of food animals to enhance and protect the environment*. Lewis Publishers. New York, NY. pp 219-234.
- Johnson, J.M.F., Franzluebbbers, A.J., Lachnicht, S. and Reicosky, D.C. 2007. Review: Agricultural opportunities to mitigate greenhouse gas emissions. *Environmental Pollution* 150: 107-124.
- Kebreab, E., Clark, K., Wagner-Riddle, C. and France, J. 2006. Methane and nitrous oxide emissions from Canadian animal agriculture: A review. *Canadian Journal of Animal Science* 86: 135-158.
- Klass, D.L. 1984. Methane from anaerobic fermentation. *Science* 223: 1021-1028.
- Kujawa, M.A. 1994. Energy partitioning in steers fed cottonseed hulls and beet pulp. PhD Dissertation. Colorado State University. Fort Collins, CO.
- Lagesse, G., Small, J.A., Scott, S.L., Crow, G.H., Block, H.C., Alemu, A.W., Robins, C.D., and Kebreab, E. 2011. Predictions of enteric methane emissions for various summer pasture and winter feeding strategies for cow calf production. *Animal Feed Science and Technology* 166-167: 678-687.
- Lee, C., Hristov, A.N., Hyler., K.S., Cassidy T.W., Long, M., Varga G.A., de Veth, M.J., Patton, R.A. and Parys, C. 2011. Effects of dietary protein concentration and coconut oil supplementation on nitrogen utilization and production in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 94: 5544-5557.
- Lee, C., Hristov, A.N., Cassidy T.W., Heyler, K.S., Lapierre, H., Varga G.A., de Veth, M.J., Patton, R.A. and Parys, C. 2012. Rumen-protected lysine, methionine,

- and histidine increase milk protein yield in dairy cows fed metabolizable protein deficient diet. *Journal of Dairy Science* 95: 6042-6060.
- Lee, S.Y. and Ha, J.K. 2002. Effects of essential oil on in vitro production and fermentation. Proc. 4<sup>th</sup> Korea-Japan Joint Symposium on Rumen Metabolism and Physiology. Jeju. Korea.
- Le-Liboux, S. and Peyraud, J.L. 1999. Effect of forage particle size and feeding frequency on fermentation patterns and sites and extent of digestion in dairy cows fed mixed diets. *Animal Feed Science and Technology* 76: 297-319.
- Machmüller, A. and Kreuzer, M. 1999. Methane suppression by coconut oil and associated effects on nutrient and energy balance in sheep. *Canadian Journal of Animal Science* 79: 65-72.
- Machmüller, A. and Clark, H. 2006. First results of a meta-analysis of the methane emission data of New Zealand ruminants. *International Congress Series* 1293: 54-57
- Macon, B., Sollenberger, L. E., Moore, J. E., Staples, C. R., Fike, J. H. and Portier, K. M. 2003. Comparison of three techniques for estimating the forage intake of lactating dairy cows on pasture. *Journal of Animal Science* 81: 2357–2366.
- MAFF. 1984. Energy allowances and feeding systems for ruminants. London, UK. Reference Book 433. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food.
- Martínez-Fernández, A. 1995. Determinaciones analíticas para el conocimiento del valor nutritivo de un alimento. Importancia de la preparación de la muestra para su análisis. Nuevas tendencias. Pastos y productos ganaderos. EA China, A. Barquin (Ed). Tenerife, Editorial Piensos Biona.
- Martin, C., Morgavi, D., Doreau, M. and Jouany, J.P. 2006. Comment réduire la production de méthane chez les ruminants. In *Fourrages* 187 : 283-300.
- Martin, C., Morgavi, D.P. and Doreau, M. 2009. Methane Mitigation in ruminants : from microbe to the farm scale. In *Animal* vol 4. Issue 3: 351-365.
- Mathison, G.W., Okine, E.K., McAllister, T.A., Dong, Y., Galbraith, J. and Dmytruk, O.I.N. 1998. Reducing methane emissions from ruminant animals. *Journal of applied Animal Research* 14: 1-28.
- McAllister, T.A., Okine., E.K., Mathison, G.W. and Cheng, K.J. 1996. Dietary, environmental and microbiological aspects of methane production in ruminants. *Canadian Journal of Animal Science* 76: 231-243.

- McCaughey, W. P., Wittenberg, K. and Corrigan, D. 1999. Impact of pasture type on methane production by lactating beef cows. *Canadian Journal of Animal Science* 79: 221-226.
- McDonald, P., Edwards, R.A., Greenhalgh, J.F.D., Morgan, C.A., Sinclair, L.A. and Wilkinson, R.G. 2011. *Animal Nutrition* 7<sup>th</sup> edition. Zaragoza. España
- Mills, J.A.N., Kebreab, E., Yates, C. M., Crompton, L.A., Cammell, S.B., Dhanoa, M.S., Agnew, R.E. and France, J. 2003. Alternative approaches to predicting methane emissions from dairy cows. *Journal of Animal Science* 81: 3141-3150.
- Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. 2012. *Inventarios Nacionales de Emisiones a la Atmósfera 1990-2012. Volumen 2: Análisis por Actividades SNAP.*
- Moe, P.W. and Tyrrell, H.F. 1979. Methane production in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 62: 1583-1586.
- Moss, A., Jouany, J-P. and Newbold, J. 2000. Methane production by ruminants: its contribution to global warming. *Annales de Zootechnie* 49: 231-253.
- Murphy, J.J., Connolly, J.F. and McNeill, G.P. 1995. Effects of milk fat composition and cow performance of feeding concentrates containing full fat rapeseed and maize distillers grains on grass-silage based diets. *Livestock Production Science* 44: 1-11.
- Mutsvangwa, T., Edwards, I.E., Topps, J.H. and Paterson, G.F.M. 1992. The effects of dietary inclusion of yeast culture (Yea-Sacc) on patterns of rumen fermentation, food intake and growth of intensive fed bulls. *Animal Production* 55: 35-40.
- Navarro-Villa, A. O'Brien, M., Lopez, S., Boland, T.M. and O'Kiely, P. 2011. In vitro rumen methane output of red clover and perennial ryegrass assayed using the gas production technique (GPT). *Animal Feed Science and Technology* 168: 152-164.
- NRC (National Research Council). 1989. *Nutrient Requirements of Dairy Cattle* (6<sup>th</sup> Rev. Ed.) Washington, D.C.: National Academy Press.
- NRC (National Research Council). 2001. *Nutrient requirements of dairy cattle* the seventh revised edition.
- O'Mara, F.P., Beauchemin, K.A., Kreuzer, M. and McAllister, T.A. 2008. Reduction of greenhouse gas emissions of ruminants through nutritional strategies. In

- Rowlinson, P., Steele, M., Nefzaoui, A. Proceeding International Conference. Livestock and Global Climate Change. Hammamet. Tunisia.
- Patra, A.K. and Saxena, J. 2010. Review: A new perspective on the use of plant secondary metabolites to inhibit methanogenesis in the rumen. *Phytochemistry* 71: 1198-1222.
- R Core Team (2014) R: A language and environment for statistical computing. R foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Riveros, E. and Argamentería, A. 1987. Métodos enzimáticos de la predicción de la digestibilidad in vivo de la materia orgánica de forrajes. I. Forrajes verdes. II. Henos. II. Ensilados y pajas. *Avances en Producción Animal*. 12: 49-75.
- Rochinotti, D. 1998. Model components of forage-fed cattle systems: Energy expenditure of grazing cattle and prediction of intake in dairy cows. Ph.D. Diss., University of Florida, Gainesville.
- Salençon, J. Carpentier, A., Blanchet, R. and Puget, J-L. 2010. Le changement climatique. Débat sur le climat le 20 septembre 2010 à l'Académie des sciences. Institut de France.
- Sawyer, C.N. and McCarty, P.L. 1978. *Chemistry for Environmental Engineering*. 3<sup>rd</sup> edition. Mc. Graw -Hill Book Company. p534.
- Seguin, B. and Soussana, J-F. 2008. Emissions de gaz à effet de serre et changement climatique : causes et conséquences observées pour l'agriculture et l'élevage. *Courrier de l'environnement de l'INRA* 55: 79-91
- Solomon, S., Qin, D., Manning, M., Chen, Z., Marquis, M., Averyt, K.B., Tignor, M. and Miller H.L. 2007. *Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge, UK, and New York, NY: Cambridge University Press.
- Sun, X. Z., Hoskin, S. O., Zhang, G. G., Molano, G., Muetzel, S., Pinares-Patiño, C. S., Clark, H. and Pacheco, D. 2012. Sheep fed forage chicory (*Cichorium intybus*) or perennial ryegrass (*Lolium perenne*) has similar methane emissions. *Animal Feed Science and Technology* 172: 217-225.
- Tavendale, M.H., Meagher, L.P., Pacheco, D., Walker, N., Attwood, G.T. and Sivakumaran, S. 2005. Methane production from in vitro rumen incubations with *Lotus pedunculatus* and *Medicago sativa*, and effects of extractable

- condensed tannin fractions on methanogenesis. *Animal Feed Science and Technology* 123-124: 403-419.
- Tubiello, F.N., Córdor-Golec, R.D., Salvatore, M., Piersante, A., Federici, S., Ferrara, A., Rossi, S., Flammini, A., Cardenas, P., Biancalani, R., Jacobs, H., Prasula, P., and Prosperi, P. 2015. Estimación de emisiones de gases de efecto invernadero en la agricultura. FAO, Roma, pp. 180.
- U.S. EPA (United States Environmental Protection Agency). 2007. Inventory of U.S. Greenhouse Gas Emissions and Sinks: 1990-2005. EPA-430-R-07-002.
- Vandaele, D., Lebreton, A. and Faraco, B. (eds) 2010. Agriculture et gaz à effet de serre: état des lieux et perspectives. Fondation Nicolas Hulot pour la nature et l'homme. Réseau action climat, France.
- Van der Honing, Y., Weiman, B.J., Steg, A. and Van Donselaar, B. 1981. The effect of the fat supplementation of concentrates on digestion and utilization of energy by productive dairy cattle. *Netherlands Journal of Agriculture Science* 29: 79-85.
- Van Dorland, H.A., Wettstein, H-R., Leuenberger, H. and Kreuzer, M. 2007. Effect of supplementation of fresh and ensiled clovers by ryegrass on nitrogen loss and methane emission of dairy cows. *Livestock Science* 111: 57-69.
- Van Kessel, J.A.S. and Russell, J.B. 1996. The effect of pH on ruminal methanogenesis. *FEMS Microbiology Ecology* 20: 205-210.
- Van Soest, P. J., Robertson, J. B. and Lewis, B. A. 1991. Methods of dietary, neutral detergent fiber and non starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science* 74: 3583-3597.
- Van Soest, P.J. 1994. Nutritional ecology of the ruminant. 2<sup>nd</sup> edition. Cornell University Press, pp 476.
- Velarde-Guillén, J., Jiménez-Calderón, J.D., Martínez-Fernández, A., and Vicente F. 2015. Effect of organic fertilization of maize forage on greenhouse gas emissions by dairy cows. *Grassland Forage in Europe* 20: En Prensa.
- Vermorel, M. 1995. Emissions annuelles de méthane d'origine digestive par les bovins en France. Variations selon le type d'animal et le niveau de production. *INRA Production Animale* 8 : 265-272.
- Yan, T., Agnew, R. E. and Gordon, F. J. 2002. The combined effects of animal species (sheep versus cattle) and level of feeding on digestible and metabolizable energy concentrations in grass silage based diets of cattle. *Animal Science* 75:141-151.

- Yates, C. M., Cammel, S. B., France, J. and Beever, D.E. 2000. Prediction of methane emissions from dairy cows using multiple regression analysis. Proceedings of the British Society of Animal Science 2000, 94.
- Waghorn, G.C., Tavendale, M.H. and Woodfield, D.R. 2002. Methanogenesis from forages fed sheep. Proceedings of the New Zealand Grassland Association 64: 167-171.
- Waghorn, G. 2008. Beneficial and detrimental effects of dietary condensed tannins for sustainable sheep and goat production - Progress and challenges. Animal Feed Science and Technology 147: 116-139.
- Wallace, R.J., McEwan, N.R. and McIntosh, F.M., Teferedegne, B., Newbold, C.J. 2002. Natural products as manipulators of rumen fermentation. Asian Australasian Journal of Animal Science 15: 458-468.
- Watson, R.T., Rohde, H., Oeschger, H. and Siegenthaler, U. 1990. Greenhouse gases and aerosols. In: Climate Change 1990. The IPCC scientific assessment. Contribution of working group I to the Intergovernmental Panel on Climate Change (Houghton, J.T., Jenkins, G.J. and Ephraums, J.J.). Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, NY, USA.
- Wenk, C. 2003. Herbs and botanicals as feed additives in monogastric animals. Asian Australasian Journal of Animal Science 16: 282-289.
- Wilkerson, V. A., Casper, D. P. and Mertens, D. R. 1995. The prediction of methane production of Holstein cows by several equations. Journal of Dairy Science 78: 2402-2414.
- Williams, Y.J., Walker, G.P., Doyle, P.T., Egan, A.R. and Stockdale, C.R. 2005. Rumen fermentation characteristics of dairy cows grazing different allowances of Persian clover- or perennial ryegrass-dominant swards in spring. Australian Journal of Experimental Agriculture 45: 665-675.