



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de Máster

Título:

**Optimización del aporte de proteína en la ración a los
requerimientos de las vacas en producción**

**Optimization of the protein contribution in the ration to the
requirements of the cows in production**

Autor

Douaa ELOUADAF

Director/es

**Dr. Fernando Vicente Mainar
Dra. Adela Martínez Fernández**

Facultad de Veterinaria

Año: 2018-2019

Agradecimientos

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

A toda mi familia, con especial mención a mis padres y mis hermanos sobre todo Aya a quienes debo todo el éxito que he realizado, por su continuo apoyo y por su paciencia.

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 los medios técnicos necesarios para la realización del trabajo.

A Armando Occon, coordinador del máster, por la ayuda durante el master.

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 en este trabajo.

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

Un agradecimiento especial a los trabajadores de la finca de SERIDA, Pedro, Luis, José, Javier, Ramón, Jesus por su ayuda durante el periodo del ensayo.

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

A mi pareja que a pesar de la distancia siempre ha estado dispuesta a ayudarme en lo que sea y a la hora que sea.

Y a mis amigos Nasser, Matutina, Ikram, Senen, María, Silvia, Loubna y todos los que he podido conocer durante el tiempo que he estado en España, gracias por nuestra amistad.

Este trabajo ha sido co-financiado por el proyecto INIA RTA2015-00058-C06-02, por PCTI 2018-2020 (GRUPIN NYSA: IDI2018-000237) y Fondos FEDER.

Douaa Elouadaf es beneficiaria de una beca CIHEAM/IAMZ.

Índice

Índice de tablas.....	V
Índice de figuras.....	VII
Índice de fotos.....	IX
Abreviaturas.....	XI
Resumen.....	XIII
Summary.....	XV
Résumé.....	XVII
Introducción.....	3
Objetivo.....	9
Parte 1: Revisión bibliográfica.....	13
Sección 1: Los problemas medioambientales del nitrógeno, y su impacto en la agricultura y la producción animal.....	13
I. Nitrógeno reactivo en el medio ambiente.....	13
1. Diferentes formas de N.....	13
2. Producción y procesamiento del nitrógeno dentro de los ecosistemas y la biosfera (ambiente, agricultura).....	14
II. Procesos de transformación de nitrógeno por los animales.....	16
III. Impacto climático del nitrógeno asociado a la agricultura.....	17
Sección 2: Flujo del nitrógeno en diferentes sistemas de producción animal.....	19
I. Flujo del nitrógeno por la ganadería.....	19
1. Balance de nitrógeno a nivel de explotación.....	19
2. Los efluentes del ganado en relación con las emisiones de gases de efecto invernadero .	20
3. Comparación de flujos de nitrógeno en algunos sistemas de producción.....	22
II. Flujos de nitrógeno en la ganadería de bovino.....	23
1. Balance de nitrógeno en rumiantes.....	23
2. Factores de variación de la excreción de nitrógeno.....	25
3. Factores de variación de las emisiones de amoníaco por el ganado bovino.....	28
Sección 3: Requerimientos en proteína, digestión y excreción de nitrógeno por vacas lecheras.....	30
I. Necesidades de mantenimiento y de producción de proteína de las vacas lecheras.....	30
II. Mecanismos del suministro de la proteína sobre la regulación de la ingestión.....	31

1.	La respuesta de la ingestión proteína	31
2.	Mecanismo de regulación.....	32
III.	La digestión de la proteína por vacas lecheras	33
IV.	Suministro de la proteína en la glándula mamaria	34
V.	La excreción del nitrógeno	35
1.	Excreción de N en heces	35
2.	Excreción de N en orina	36
3.	Excreción de N en la leche	37
VI.	Eficiencia del uso del nitrógeno por vacas lechera	37
Sección 4: Estrategias para reducir la emisión del nitrógeno al ambiente		38
I.	Gestión de la alimentación y mejora de la eficiencia alimentaria del nitrógeno	38
II.	Gestión del purín como fertilizante	39
1.	Cubrir la fosa de almacenamiento del purín.....	39
2.	Modificar el modo de aplicación de purines como fertilizantes.....	39
3.	Utilizar el separador de fases de purín	40
Parte 2: Materiales y métodos		45
I.	Presentación general del ensayo.....	45
1.	Animales	45
2.	Alimentación	45
II.	Medidas y muestreos.....	46
1.	Alimentos	46
2.	Producción y composición de la leche	48
3.	Excreción de heces y orina y sus análisis.....	48
III.	Diseño experimental, cálculos y análisis estadísticos	51
Parte 3: Resultados.....		55
I.	Ingestión de las dietas	55
II.	Producción de leche y su composición química.....	58
III.	Excreción de N, P, K en heces	58
IV.	Excreción de N, P, K en la orina	61
V.	Eficiencia del nitrógeno EN	62
Parte 4: Discusión		65
I.	Ingestión voluntaria.....	65

II. Producción de leche y su composición química.....	66
III. Excreción de N, P, K en heces y orina	66
IV. Eficiencia del nitrógeno EN	67
Conclusión.....	71
Referencias bibliográficas	75

Índice de tablas

Tabla	Título	Página
Tabla I.1.	Eficiencia del nitrógeno (N) por el ganado bovino según el tipo de producción	24
Tabla I.2.	Influencia del sistema de alimentación sobre la deyección del nitrógeno anual de un rebaño de 40 vacas lecheras	27
Tabla II.1.	Composición de las raciones	46
Tabla II.2.	Esquema de distribución de raciones unifeed a los tres grupos de animales durante los tres periodos del ensayo	51
Tabla III.1.	Valor nutritivo de las raciones ofertadas	55
Tabla III.2.	Valor nutritivo del rechazo	56
Tabla III.3.	Ingesta y rechazo de los nutrientes por las vacas lecheras alimentadas con diferentes concentraciones de proteína bruta	57
Tabla III.4.	Producción y composición de la leche según el nivel de proteína de la dieta	58
Tabla III.5.	Composición química de las heces según el nivel de proteína en la dieta	59
Tabla III.6.	Excreción total de heces y cantidad diaria excretada según su composición	59
Tabla III.7.	Digestibilidad de los nutrientes consumidos por las vacas lecheras alimentadas con diferentes concentraciones de proteína bruta	60
Tabla III.8.	Composición química de la orina según el nivel de proteína en la dieta	61
Tabla III.9.	Excreción total de orina y cantidad diaria excretada por orina de N-Total, N-NH ₃ , P y K según la dieta	62
Tabla III.10.	Eficiencia del nitrógeno según el nivel de proteína en la dieta	62

Índice de figuras

Figura	Título	Página
Figura.1	Relación entre el nitrógeno ingerido por las vacas lecheras y las emisiones de amoniaco con las dietas siguiendo los estándares americanos de proteína o excedentes	29
Figura.2	Efecto de la relación entre la proteína y la energía disponible en la dieta sobre la ingestión de materia seca	31

Índice de fotos

Fotos	Título	Página
Foto.1	Sistema de recolección de heces y orina	49

Abreviaturas

AA: Aminoácidos	N-FAD: Nitrógeno ligado a la FAD
AAE: Aminoácidos esenciales	NH₃: Amoniac
ADN: Acido desoxirribonucleico	N_i: Nitrógeno ingerido
ALM: Almidón	NIR: Espectrometría en el infrarrojo cercano
AP: Alta proteína	N_h: Nitrógeno excretado en heces
BP: Baja proteína	N_l: Nitrógeno excretado en leche
CEN: Cenizas	N-NH₃: Nitrógeno amoniacal
CH₄: Metano	N_o: Nitrógeno excretado en orina
CO₂: Dióxido de carbono	NO: monóxido de nitrógeno
DMO: Digestibilidad de materia orgánica	NO₂: Dióxido de nitrógeno
EE: Extracto Etéreo	NO₂⁻: Nitrito
E.E: Error estándar	NO₃⁻: Nitrato
ELN: Extracto Libre de Nitrógeno	N-Total: Nitrógeno total
EM: Energía Metabolizable	O₂: Oxígeno
ENAC: Entidad Nacional de Acreditación	P: fósforo
ENL: Energía Neta de lactación	PB: Proteína bruta
FAD: Fibra Acido Detergente	PDI: Proteína degradable en el intestino
FB: Fibra Bruta	PDIE: Proteína digestible a nivel intestinal procedente de la energía
FND: Fibra Neutro Detergente	PM: Materia Particulada
GEI: Gases de Efecto Invernadero	PV: Peso Vivo
HCL: Ácido clorhídrico	RDP: Proteína degradable en el rumen
K: Potasio	SCC: Células somáticas
MOD: Materia orgánica digestible	SNS: Solidos no grasos
MS: Materia seca	SERIDA: Servicio Regional De Investigación y Desarrollo Agroalimentario
MSI: Materia Seca Ingerida	TMR: Ración Completa Mezclada
MP: Media proteína	UDP: Proteína no degradable en el rumen
N₂O: Protóxido	UFL: Unidad forrajera leche

Resumen

En general, menos del 30% del nitrógeno ingerido por el ganado lechero se retiene en la leche. Grandes cantidades de nitrógeno se excretan en el estiércol y especialmente en la orina, con efectos adversos en el medio ambiente. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la reducción del contenido de proteína bruta (PB) en la dieta sobre el balance de nitrógeno y su eficiencia de uso por parte de las vacas Holstein en el primer tercio de lactación. Para ello, seis vacas Holstein con un peso corporal inicial de $677 \pm 45,86$ kg y un rendimiento de leche diario de $35,44 \pm 6,38$ kg se dividieron entre tres tratamientos ($n = 2$ vacas por grupo) con tres diferentes concentraciones de PB en la ración de 17%, 15% y 13% según un modelo de doble cuadrado latino de 3×3 dividido en tres períodos de 14 días.

La ingestión de MS no se vio afectada por el nivel de PB en la dieta con $20,41 \pm 1,21$ kg ingeridos por día y una ingestión media de nitrógeno de $507,23 \pm 22,54$ g N / día ($P > 0,05$). La producción de leche ($31,87 \pm 2,57$ kg / día) y los porcentajes de proteína de leche ($2,95 \pm 0,04\%$) y grasa ($4,17 \pm 0,24\%$) no se vieron afectados por la reducción de PB en la dieta ($P > 0,05$). La eficiencia de uso de nitrógeno (EN) fue de 29,92; 27,94 y 31,10%, respectivamente, para los tratamientos del 17%, 15% y 13% ($P > 0,05$). De manera similar, la excreción de nitrógeno total (N-total) o amoniacal (N-NH₃) en las heces no se vio afectada por el contenido de PB en la dieta. La digestibilidad aparente de los nutrientes no fue diferente entre los 3 tratamientos considerados ($P > 0,05$), excepto para la digestibilidad aparente del PB que fue significativamente más alta en el tratamiento del 15% de PB ($P < 0,05$). El N-NH₃ excretado en la orina fue casi cuatro veces menor con la dieta del 13% (13%: 0,66 g N / día, 17%: 2,66 g N / día, $P < 0,05$), el N-total excretado en la orina fue significativamente bajo en el tratamiento de 13% de PB. El 33% de fósforo (P) y el 21% de potasio (K) ingerido se excretó en las heces, mientras que 0,16% de P y 25% de K se excretaron en la orina, respectivamente.

Se concluye que la dieta que contiene 13% de PB satisface los requisitos de proteína de las vacas lecheras que producen 30,76 kg de leche / día, con menos N-NH₃ y N-total

excretados por la orina y una EN de 31%. Sin embargo, esta estrategia debe validarse por períodos más largos y con otros sistemas de gestión del purín.

Summary

Generally, less than 30% of dairy cattle's nitrogen intake is retained in milk. Large amounts of nitrogen are excreted in manure, especially in the urine, with damaging effects on the environment. The objective of this work was to evaluate the effect of the reduction in crude protein content (CP) in the diet on nitrogen balance and its efficiency of use by Holstein cows in the first third of the lactation cycle. Six Holstein cows with an initial body weight of 677 ± 45.86 kg and a daily milk yield of 35.44 ± 6.38 kg were divided among three treatments ($n=2$ cows per group) with three different level of CP in the ration of 17%, 15% and 13% according to a double Latin square model of 3×3 divided into three periods of 14 days.

Ingestion of the DM was not affected by CP level in the diet with 20.41 ± 1.21 kg ingested daily, and an average daily intake of N the 507.23 ± 22.54 g N / day ($P > 0.05$). Milk production (31.87 ± 2.57 kg / day) and percentages of milk protein ($2.95 \pm 0.04\%$) and fat ($4.17 \pm 0.24\%$) were not affected by the reduction of CP in the diet ($P > 0.05$). The efficiency of use of nitrogen (EN) was 29.92, 27.94 and 31.10% respectively for the treatments 17%, 15% and 13% ($P > 0.05$). Similarly, the excretion of total (N-total) or ammonia (N-NH₃) nitrogen in faeces was not affected by CP content in the diet. The apparent nutrient digestibility was not different between the three dietary treatments ($P > 0.05$), except for the apparent digestibility of CP that was significantly high in the treatment of 15% ($P < 0.05$). N-NH₃ excreted in the urine was almost four times lower on the diet with 13% than 17% CP (13%: 0.66 g N / day, 17%: 2.66 g N / day, $P < 0.05$), and N-total excreted in the urine was significantly low in 13% treatment. 33% phosphorus (P) and 21% potassium (K) was excreted in the faeces, while 0.16% of P and 25% of K were excreted in the urine respectively.

It is therefore concluded that the diet containing 13% CP meets the protein requirement for lactating cows producing 30.76 kg of milk / day, with less N-NH₃ and N-total excreted in the urine and an EN of 31%. However, this strategy must be validated for longer periods and with other manure management systems.

Résumé

En général, moins de 30% d'azote apporté aux bovins laitiers est retenu dans le lait. De grandes quantités d'azote sont excrétées dans le fumier, en particulier dans l'urine, avec des effets néfastes sur l'environnement. L'objectif de ce travail était d'évaluer l'effet de la réduction de la teneur en protéine brute (PB) dans le régime sur le bilan azoté et son efficacité d'utilisation par des vaches Holstein en premier cycle de lactation. Six vaches laitières Holstein avec un poids corporel initial de $677 \pm 45,86$ kg et de production de lait journalier de $35,44 \pm 6,38$ kg ont été répartis entre trois traitements (n = 2 vaches par groupe) avec trois différentes teneurs en PB dans la ration de 17%, 15% y 13% selon un modèle carré latin de 3 x 3 divisées en trois périodes de 14 jours.

L'ingestion de MS n'a pas été affectée par le niveau de PB dans la ration avec $20,41 \pm 1,21$ kg / jour. L'ingestion d'azote moyenne a été de $507,23 \pm 22,54$ g N / jour ($P > 0,05$). La production de lait ($31,87 \pm 2,57$ kg / jour) et les pourcentages de protéines du lait ($2,95 \pm 0,04\%$) et de matières grasses ($4,17 \pm 0,24\%$) n'étaient pas affectés par la réduction de PB dans La ration ($P > 0,05$). Résultant que l'efficacité d'utilisation de l'azote (EN) a été de 29,92, 27,94 y 31,10% respectivement pour les traitements 17%, 15% et 13% ($P > 0,05$). De même façon, l'excrétion d'azote total (N-total) ou ammoniacal (N-NH₃) dans les fèces n'a pas été affectée par le contenu de PB dans la ration. La digestibilité apparente des nutriments n'était pas différente entre les traitements diététiques ($P > 0,05$), à part la digestibilité apparente de PB qui a été significativement haute dans le traitement de 15% de PB ($P < 0,05$). N-NH₃ excrété dans l'urine était presque quatre fois plus faible avec le régime de 13% (13%: 0,66 g N / jour; 17%: 2,66 g N / jour; $P < 0,05$) y el N-total excrété dans l'urine a été significativement bas en traitement de 13%. 33% de phosphore (P), 21% de potassium (K) ont été excrété dans les fèces, cependant, 0,16% de P et 25% de K ont été excrétés dans l'urine respectivement.

Il est donc à conclure que le régime alimentaire contenant 13% de PB répond aux besoins en protéines des vaches laitières produisant de 30,76 kg de lait / jour, avec moins N-NH₃ et N-total excrétés dans l'urine et une EN de 31%. Cependant, il faut valider cette stratégie pour de plus longues périodes et d'autre système de gestion de fumier.

Introducción

Introducción

La intensificación productiva del sector de vacuno de leche se ha basado en un gran consumo de inputs externos (piensos proteicos y fertilizantes minerales) con una concentración de la producción en menos explotaciones y un incremento del número de animales por explotación y por hectárea, lo que ha conducido a un aumento en determinadas zonas del volumen de purines y estiércoles. Estos son una fuente potencial de contaminación cuando no se aplican de acuerdo a los códigos de buenas prácticas agrarias, pudiendo afectar a las aguas (eutrofización por lixiviación de nitratos y arrastre de fósforo), y a la atmosfera (emisiones de gases de efecto invernadero, volatilización de amoníaco y malos olores), sobre todo cuando existe una falta de capacidad de almacenamiento, una aplicación inadecuadas que utiliza el suelo como lugar de descarga o en zonas de alta densidad ganadera con falta de terreno para su aplicación como fertilizante. Sin embargo, su correcta aplicación puede incrementar el secuestro de carbono (C) en suelos con beneficios indirectos en sus propiedades físicas y químicas y puede reducir la utilización de fertilizantes minerales y las subsiguientes emisiones de N_2O asociadas con su fabricación y uso, así como las emisiones de CO_2 provenientes de fuentes fósiles usadas en su fabricación y transporte.

La excreción media, por orina y heces, de una vaca en fase intermedia de lactación es de un 75% de N, 71% de P y 93% de K ingerido (Wanapat et al., 2009). Las dietas que contienen un exceso de proteína no son deseables porque el exceso de N es excretado, resultado en una pérdida neta de N (Broderick, 2003). Esta ineficiencia aumenta el coste de la suplementación de proteínas y aumenta el potencial de contaminación del medio ambiental con el nitrógeno.

La nutrición debe mejorar la eficiencia del uso del nitrógeno, lo que implica reducir la ingestión de proteína, cumplir con los requisitos para la síntesis de proteínas de la leche, así como reducir el coste de la alimentación y el riesgo de contaminación del medio ambiental por el nitrógeno (Bahrami-Yekdangi et al., 2014). Una vía de solución es reducir el aporte proteico de la ración. De hecho, la disminución de PB en la dieta del 18,4% al 15,1%

disminuyó linealmente la cantidad de N en orina expresada en gramos por día o como un porcentaje de la ingesta de N (Broderick, 2003). Estos resultados son coherentes con Fadul-Pacheco et al., (2017), quienes informaron que niveles de PB entre 16 y 16,5% fueron suficientes para maximizar la producción de leche sin exceso de nitrógeno en el purín.

El ciclo de nutrientes en la explotación (excretas-suelo-cultivo-animales) debe optimizarse reciclando en la propia explotación las deyecciones, consiguiendo un ciclo cerrado y con menores externalidades (Eisler et al., 2014) y controlando las pérdidas en todo el ciclo productivo, teniendo en cuenta las condiciones específicas de la explotación (tipología, alimentación, clima, superficie forrajera, tipo de suelo...). En la actividad agraria existen tres fuentes principales de emisión: el N₂O procedente de suelo por aplicación de fertilizante (52%), el CH₄ debido a la fermentación entérica de los rumiantes (32%) y el N₂O y CH₄ derivados del manejo de purines y estiércoles (16%) (Van Doorslear et al., 2015).

La gestión de las explotaciones, y en especial la dieta y el manejo de fertilizantes, purines y estiércoles, se han identificado como los factores más importantes que determinan la huella de carbono de la leche (Del Prado et al., 2013).

La optimización de la fertilización nitrogenada de los cultivos y del manejo del purín son aspectos fundamentales para mitigar la producción de gases de efecto invernadero (Del Prado et al., 2010).

La necesidad de conseguir una producción sostenible, donde se conjugue la competitividad económica y las buenas prácticas que minimizan el impacto de las actividades agrarias sobre la calidad de los recursos naturales (agua, aire) y que permiten obtener productos con mayores garantías para la salud, es una demanda social que ha obligado a la UE a establecer normativas que afectan a las explotaciones de vacuno de leche y a la gestión de sus deyecciones.

Así, con el objetivo de reducir el impacto de la actividad agraria en las aguas se ha establecido la Directiva de Nitratos (1991/676/EC) y la Directiva Marco del agua (2000/60/EC). La directiva de Nitratos define la existencia de zonas vulnerables en función del nivel de contaminación por nitrato, con planes de actuación que limitan el periodo de

aplicación de fertilizantes y la capacidad de almacenamiento mínimo, con un límite de aplicación de 170 kg de N orgánico / ha y año. La Directiva del Agua limita la contaminación por fosfatos.

Además, la PAC establece el “Greening” (2013/1037/EC) y los programas de desarrollo rural del Pilar 2, donde algunas de las prácticas subvencionables están ligadas íntimamente a la mejora en la gestión de los purines y estiércoles.

La estrategia actual para luchar contra el calentamiento global pretende reducir el uso de combustibles fósiles e incrementar el secuestro de C (Johnson et al., 2007).

Objetivos

Objetivo

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de tres niveles de proteína bruta en la dieta de vacas lecheras sobre:

- ✓ La reducción de la excreción de nitrógeno en el purín y la emisión del amoníaco (NH_3) sin que la cantidad ni la calidad de la leche se vean afectadas.
- ✓ La gestión y la mejora de la calidad del purín como un co-producto de la granja que se puede usar como fertilizante agrícola.

Revisión bibliográfica

Parte 1: Revisión bibliográfica

Sección 1: Los problemas medioambientales del nitrógeno, y su impacto en la agricultura y la producción animal

I. Nitrógeno reactivo en el medio ambiente

1. Diferentes formas de N

El nitrógeno es un elemento esencial de la vida porque es constitutivo de todos los seres vivos (ADN, proteínas...). Es esencial en la producción animal y vegetal en todas sus formas, desde los organismos microbianos hasta los más avanzados y complejos. Sin embargo, incluso siendo muy abundante en la superficie del globo, los seres vivos solo pueden aprovechar muy marginalmente esta abundancia: más del 99% de este nitrógeno está presente en forma de gas (N_2), que los seres vivos no pueden utilizar. Solo los microorganismos de los géneros *Rhizobium* y *Frankia* y las cianobacterias pueden fijarlo y transformarlo en amoníaco y luego en nitrógeno orgánico (Cleveland et al., 1999).

Una de las particularidades del nitrógeno en la biosfera es la coexistencia de formas orgánicas y minerales, así como de formas reducidas y oxidadas. Esta situación se debe al hecho de que las formas que toma el nitrógeno no dependen únicamente de las condiciones fisicoquímicas del medio, sino también de la actividad biológica. (Erisman et al., 2011). Así, se puede encontrar el nitrógeno en las formas siguientes:

- Nitrógeno (N_2): se encuentra principalmente en la atmósfera. Debido a su inercia química, representa un conjunto de nitrógeno no tóxico de fácil acceso para los microorganismos que se unen a todos los ecosistemas terrestres y marinos. (Erisman et al., 2011).
- Nitrógeno amoniacal (NH_3): es la forma más reducida de nitrógeno. Se puede encontrar en forma de amonio (NH_4^+) y amoníaco (NH_3). El amonio se encuentra en grandes cantidades en los efluentes del ganado porque los animales excretan su excedente de nitrógeno en esta forma. Por lo tanto, el nitrógeno amoniacal

generalmente representa entre el 40 y el 75% del nitrógeno total de la orina. El amonio es un sólido, mientras que a temperaturas y presiones normales, el amoniaco es un gas y se forma durante la disociación del amonio en solución. Esta transferencia está condicionada por los equilibrios físico-químicos determinados por las propiedades del disolvente (pH y temperatura) y el medio (temperatura) (Wolfe y Patz, 2002).

- Óxidos de nitrógeno: incluyen monóxido (NO), dióxido (NO₂), protóxido (N₂O), nitrito (NO₂⁻) y nitrato (NO₃⁻). Todos son productos o subproductos de nitrificación o desnitrificación (Hutchinson y Davidson, 1993). Estos gases se producen en pequeñas cantidades, pero tienen impactos significativos en el medio ambiente atmosférico (Dentener et al., 2006), siendo el N₂O un potente gas de efecto invernadero (Forster et al., 2007).

2. Producción y procesamiento del nitrógeno dentro de los ecosistemas y la biosfera (ambiente, agricultura).

a. Fijación biológica

Cientos de bacterias y actinomicetos pueden convertir el N en nitrógeno reactivo. La mayoría son bacterias "libres" que se encuentran con mayor frecuencia en la rizosfera de las plantas. Algunas han establecido relaciones simbióticas con huéspedes específicos. De estas, las más importantes para los humanos son las bacterias del género *Rhizobium* debido a su asociación con las leguminosas. Esta asociación proporciona a las plantas el nitrógeno reactivo que necesitan, mientras que el huésped proporciona a las bacterias un ambiente favorable para su actividad (sustratos de anoxia y carbono). El nitrógeno fijado por el *Rhizobium*, una vez transformado en amonio, se utiliza para satisfacer las necesidades fisiológicas y estructurales de la bacteria y la leguminosa huésped. Solo una pequeña parte se libera en el suelo en forma amoniacal. El nitrógeno incorporado en la planta y la biomasa microbiana o el nitrógeno orgánico es relativamente estable y solo se liberará en el suelo cuando la planta muera y las células microbianas en forma de amonio se descompongan durante la amonificación.

b. Fijación industrial

El amoníaco se sintetiza artificialmente utilizando el proceso Haber-Bosch desde principios del siglo XX. Es el proceso industrial más rentable para fijar nitrógeno desde el aire. En todo el mundo, la producción de amoníaco representa aproximadamente el 6% del consumo mundial de gas natural (IFA, 2009). Comenzada en 1913, la fijación industrial de nitrógeno se aceleró entre 1950 y 1970 en gran parte en respuesta a la introducción de nuevos cultivares de alto rendimiento que podría dar valor a la fertilización con alto contenido de nitrógeno.

Este descubrimiento y su implementación industrial cambiaron profundamente no solo el ciclo del nitrógeno, sino también el desarrollo de la sociedad, especialmente todo lo relacionado con la producción de alimentos. Se estima que en la actualidad, entre 40 y 50% de la proteína en la dieta humana se deriva del nitrógeno obtenido por este proceso (Erisman et al., 2008). Si bien no hay duda sobre la contribución del proceso de Haber-Bosch a la mejora de la nutrición humana, las grandes cantidades de nitrógeno reactivo que se agregan anualmente a diferentes niveles en el medio ambiente representan una grave amenaza para la salud humana y el medio ambiente.

c. Absorción de nitrógeno por las plantas

La gran mayoría del nitrógeno incorporado por las plantas se realiza mediante la absorción de nitratos. Este nitrógeno proviene de varias fuentes, incluida la descomposición de la materia orgánica del suelo, los efluentes y otras enmiendas orgánicas. También en la forma mineral, por ejemplo, la urea que los fertilizantes sintéticos aportan como nitrógeno al suelo.

Una cantidad variable, pero generalmente baja, de nitrógeno también es absorbida por difusión de gases de nitrógeno atmosféricos (NO_x y NH_3) por los estomas (Asman et al., 1998). La importancia de esta vía depende principalmente de la concentración atmosférica de estos gases y puede ser una parte importante de la nutrición nitrogenada de las plantas ubicadas cerca de una fuente puntual de amoníaco, como cuerdas de ganado o almacenes de estiércol.

d. Nitrificación

La nitrificación es el resultado de la oxidación biológica de amonio a nitrito y DE nitrito en nitrato por parte de arqueobacterias, que combinan la oxidación de amonio con la síntesis de energía (ATP) y utilizan CO_2 como fuente de carbono para su crecimiento.

La velocidad de la reacción está controlada por la disponibilidad de sustratos (NH_4 , NO_2 , O_2 y CO_2) y por las propiedades físicas del medio. La nitrificación está influenciada por la temperatura, el pH del medio y el contenido de agua. La velocidad del proceso de nitrificación es baja a baja temperatura, aumenta entre 0 y 30°C y disminuye rápidamente por encima de 35°C . El máximo de nitrificación se produce a un pH entre 8 y 9. El contenido de agua del suelo tiene un doble efecto sobre la tasa de nitrificación. La nitrificación es rápida cuando se evitan condiciones extremas de humedad, temperatura y pH, como ocurre en la mayoría de los suelos agrícolas y en los ecosistemas naturales bien aireados, donde es raro ver amonio acumulado. Por otro lado, la nitrificación puede estar limitada en pastizales en suelos hidromorfos y / o ácidos, donde las plantas tomarán directamente la forma del amoniaco. De manera similar, las excretas de animales son ricas en amonio debido a que la nitrificación es nula en orina o incompleta en heces durante su almacenamiento debido a una baja aireación (Lehuger, 2009).

e. Desnitrificación

La desnitrificación es el conjunto de reacciones, principalmente llevadas a cabo dentro de los microorganismos, que lleva a la reducción de nitrato a N_2 (Lehuger, 2009). Generalmente aumenta cuando no hay abundancia de aire (capas profundas del suelo, y del almacenamiento de estiércol) y con abundancia de sustratos de carbono fácilmente descomponibles. El óxido nitroso (N_2O), es un intermediario gaseoso de la desnitrificación que puede emitirse e impactar sobre la química y la física de la atmósfera.

II. Procesos de transformación de nitrógeno por los animales

La transformación del nitrógeno vegetal en productos animales a través de la ganadería es generalmente un proceso ineficiente en comparación con el que realizan las plantas, con un

rendimiento que varía entre el 5 y el 40% según el tipo de producción y de alimento. Las proteínas de los alimentos generalmente son degradadas rápidamente por los microbios para obtener energía, lo que tiende a reducir la eficiencia aparente de la conversión de nitrógeno por los rumiantes en comparación con los monogástricos (Peyraud et al., 2012).

Cuando la proteína dietética se degrada en el rumen, los microbios liberan amonio que se absorbe con bastante rapidez a través de la pared del rumen hacia la sangre y se detoxica rápidamente en urea (Faverdin y Vérité, 2003). Esta urea, junto con la urea derivada del catabolismo de la proteína tisular, se difunde ampliamente a lo largo del espacio corporal acuoso y puede regresar al rumen ya sea por saliva o por difusión a través de la pared del rumen. La urea se transforma rápidamente de nuevo en amonio, que los microbios pueden reutilizar para su síntesis de proteínas microbianas.

Los vertebrados convierten el amonio en formas biológicamente neutras, como la urea o el ácido úrico, que excretan a través de la orina durante la micción. Esta conversión tiene un coste energético muy elevado. El N urinario es el resultado del catabolismo de las proteínas corporales y de los excedentes de nitrógeno aportado por la ración, que implican un exceso de nitrógeno degradable en el rumen que no es aprovechado por la microbiota ruminal o un exceso de aminoácidos no degradados a nivel intestinal no utilizados por el animal (Calsamiglia et al., 2010). La urea y el ácido úrico excretado son moléculas muy inestables que se transforman rápidamente al estado de amonio pudiendo emitir grandes cantidades de amoníaco al aire.

La excreción de nitrógeno excedentario por los animales también puede hacerse por vía fecal. Diferentes estudios demuestran que las dietas con diferente concentración de proteína presentan excreciones similares de N fecal pero difieren en la excreción de N urinario (Edouard et al., 2016). Esto es debido a que el factor de mayor influencia sobre el nitrógeno fecal excretado es el tamaño y el peso vivo del animal (Nennich et al., 2005).

III. Impacto climático del nitrógeno asociado a la agricultura

El impacto del nitrógeno en el medio ambiente tiene una gran diversidad, que afecta a la mayoría de los principales problemas del cambio climático y a todos los compartimentos

ambientales. En la Unión Europea, el aumento en intensidad de la producción animal, que se basa en gran parte en los alimentos importados, tiene un uso importante de nitrógeno y un impacto considerable en el medio ambiente, porque debido a la intensificación de la agricultura, las emisiones de nitrógeno se han convertido en una causa importante de problemas ambientales a nivel local, regional y global (Sutton et al., 2011a). También la emisión de N por la agricultura en Europa está asociada con altas tasas de almacenamiento y producción de estiércol (Lesschen et al., 2011). Por ello tiene gran importancia aumentar la eficiencia del uso de nitrógeno por parte de los animales y utilizar el estiércol como fertilizante de manera más eficiente, para producir menos pérdidas para el medio ambiente (van Grinsven et al., 2012).

La contaminación por nitrógeno proveniente de fuentes agrícolas se ha convertido en la principal causa de la eutrofización costera y el agotamiento del ozono estratosférico y contribuye significativamente a la contaminación del aire, del agua potable, eutrofización del agua dulce, pérdida de biodiversidad y alteración del equilibrio del efecto invernadero (Sutton et al., 2011b).

El nitrógeno está involucrado en el cambio climático de muchas maneras. El más directo es el suelo con N_2O , que representa el 4% de las emisiones totales de gases de efecto invernadero a nivel mundial (Smith et al., 2007). El principal efecto de "calentamiento" asociado con el nitrógeno es la emisión de N_2O (15-19 mW / m²), mientras que el efecto de "enfriamiento" es para el aumento del sumidero de CO_2 en la biosfera en respuesta a la deposición atmosférica nitrógeno (-30 a 8 mW / m²) (Sitch et al., 2007).

En los últimos años, se han identificado los efectos de los compuestos nitrogenados. La deposición de nitrógeno amoniacal contribuye a la acidificación de los suelos y las aguas superficiales mediante dos procesos: la nitrificación, que libera protones, y la presencia de iones nitrato en las aguas de drenaje, que los llevan a los cationes alcalinos del complejo de intercambio de suelo. Además, el uso de fertilizantes que contienen nitratos en ambientes naturales o seminaturales no siempre es beneficioso, ya que conduce a la proliferación de ciertas especies (eutrofización) y pérdida de biodiversidad (Butterbach-Bahl et al., 2011).

El nitrógeno está fuertemente involucrado en los principales problemas de calidad del aire (Hertel et al., 2011). Los óxidos de nitrógeno (NO , NO_2) contribuyen al proceso principal

de formación de ozono por reacción con compuestos orgánicos volátiles. La frecuencia de los picos de ozono está disminuyendo, pero el nivel de fondo continúa aumentando y los niveles actuales presentan riesgos para la salud humana y del ecosistema. La agricultura y la ganadería no son las principales responsables, pero las emisiones naturales de NO de los suelos (Laville et al., 2009) podría contribuir muy significativamente al aumento constante en el fondo de ozono. Un problema causado por el amoníaco, y por lo tanto muy directamente a través de la agricultura y el ganado, al formar partículas muy finas por reacción con los ácidos atmosféricos (Baek et al., 2004). Las partículas a base de amonio y nitrato son una fracción importante (con frecuencia superior al 25-30%) de las partículas atmosféricas PM10, PM2,5 y PM1, que pueden conducir a altas concentraciones totales en áreas rurales.

Sección 2: Flujo del nitrógeno en diferentes sistemas de producción animal

I. Flujo del nitrógeno por la ganadería

1. Balance de nitrógeno a nivel de explotación

La producción agrícola y la ganadera ocupan un lugar central en el ciclo del nitrógeno. Los insumos de N en los suelos agrícolas suman 27,5 Mt N (11,2 Mt como fertilizante sintético, 7,1 Mt como estiércol, 2,4 Mt como deposición atmosférica, 1,0 Mt por fijación simbiótica y 5,8 Mt de residuos de cultivos) (Leip et al., 2011). El excedente contribuye a la lixiviación de nitratos en acuíferos poco profundos y profundos (6 Mt), desnitrificación como N₂ (4,5 Mt), volatilización de amoníaco (1,6 Mt) y emisiones de N₂O y NO (0,5 Mt).

El uso de nitrógeno en la agricultura y la ganadería generalmente tiene una baja eficiencia, entre 30 y 60% para la producción de cultivos y entre 5 y 40% para la producción animal (Jarvis et al., 2011). Cuando las formas reactivas de nitrógeno están presentes en una forma móvil, tanto en la fase gaseosa (NH₃, NO, NO₂, N₂O...) como la fase líquida (nitrato, nitrógeno orgánico disuelto), pueden escapar de la cadena que va desde los insumos hasta los productos.

La agricultura es responsable de más del 95% de las emisiones de amoníaco, alrededor del 75% de las emisiones de N_2O , el 5-10 % de emisiones de NO (Citepa, 2011) y el 55% de pérdidas de nitrato (Ifen, 2002). Para las explotaciones ganaderas, estas emisiones se producen principalmente a partir de desechos animales a lo largo de la cadena de producción, en las cuadras, instalaciones y áreas de concentración de ganado, cuando los animales están en pastoreo (Flechard et al., 2007), así como durante las aplicaciones de fertilizantes minerales y orgánicos en el campo (EEA 2009, Gac et al., 2007). Las emisiones de amoníaco por parte del ganado representan más del 80% de las emisiones agrícolas totales. Esto se debe a las importantes cantidades de nitrógeno excretadas por los animales, que luego se diseminan en los cultivos, con una alta disponibilidad de nitrógeno amoniacal en las diversas etapas del manejo del estiércol y, por lo tanto, altos factores de emisión (Bittman et al., 2007). La ganadería también influye en las emisiones de N_2O , como consecuencia indirecta de los insumos de fertilizantes minerales, que se incrementan debido a la sucesión de momentos en los que puede ocurrir la emisión: el nitrógeno contenido en un efluente puede volatilizarse en las instalaciones ganaderas, las áreas de almacenamiento, y finalmente cuando se aplican al campo, cuando debe considerarse como un fertilizante mineral (Oenema et al., 2009).

2. Los efluentes del ganado en relación con las emisiones de gases de efecto invernadero

El manejo de estos excrementos animales implica diferentes tecnologías de almacenamiento, tratamiento y distribución que inducen muchas transformaciones, incluido el nitrógeno. Estas transformaciones pueden contribuir a facilitar y optimizar la recuperación y el reciclaje de estos subproductos, pero también pueden causar fugas importantes al entorno natural (aire y agua). Por ejemplo, a nivel mundial, se estima que aproximadamente 20 Mt de nitrógeno del estiércol se libera anualmente a la atmósfera como amoníaco (Olivier et al., 1998). En Europa, se estima que más del 80% del nitrógeno de los cultivos se utiliza para la alimentación animal y con las 2,3 Mt de nitrógeno que contienen los productos animales generados, se producen 8 Mt de N en forma de excremento (Leip et al., 2011). Los datos relativos a los Estados Unidos (Duxbury, 1994) muestran que de los 9 Mt de nitrógeno utilizado por el sector ganadero anualmente, poco

menos de 1 Mt se encuentra en la producción de alimentos, mientras que 7,7 Mt se encuentran en forma de estiércol animal. Durante la gestión de estos residuos, se emiten 3,9 millones de toneladas a la atmósfera en forma de NH_3 , que es casi el 50% del nitrógeno contenido en estos excrementos.

Los desechos animales tienen una relación C / N baja o muy baja (menos de 10) que los predispone a liberar nitrógeno rápidamente. Sin embargo, pueden evolucionar de manera diferente dependiendo del tipo de alojamiento de los animales. Cuando el purín se almacena en la cuadra, las emisiones de amoníaco son muy importantes, lo que en algunos casos puede suponer riesgos para la salud de los animales. Si el purín se retira rápidamente a una fosa al aire libre, generalmente se moviliza menos rápidamente que en la cuadra. Sin embargo, muchas granjas utilizan paja para la cama que ayuda a los microbios a fermentar esta materia orgánica anaeróbicamente, liberando metano más que N_2O y N_2 .

Se estima que el estiércol emite alrededor del 30% del nitrógeno que ingresa al sistema agrícola, lo que demuestra el impacto significativo de la gestión del estiércol en el ciclo del nitrógeno desde un punto de vista ambiental. Si agregamos a estas emisiones de nitrógeno en forma amoniacal, las otras emisiones a la atmósfera (N_2 , N_2O) y al agua (principalmente NO_3^-), estos datos muestran el gran interés ambiental de gestionar los desechos animales y mejorar la eficiencia del nitrógeno y de estos subproductos animales (Bittman y Mikkelsen, 2009). Teniendo en cuenta únicamente el nitrógeno reactivo en estos excrementos (NH_4^+), hay unas pérdidas del orden del 50 al 60% entre la producción de excrementos y su uso en los cultivos (Bittman y Mikkelsen, 2009).

Los rumiantes en pastoreo representan un circuito corto en el ciclo de nitrógeno, con restitución directa de estiércol y orina a la parcela. La rápida penetración de la orina en el suelo limita las pérdidas al aire, incluidas las pérdidas de amoníaco que parecen ser solo un pequeño porcentaje (rara vez más del 10%) excepto en condiciones de alta temperatura (Leterme et al., 2003). Esta orina rápidamente restaura el amonio en prados, praderas y cultivos forrajeros, el cual, si la orina no se filtra demasiado rápido a los horizontes del suelo por debajo del horizonte de la raíz, puede usarse para el crecimiento de la hierba y otros cultivos y mucho más cuando la fertilización en la superficie agraria considerada es baja y la densidad de las raíces es alta (Decau et al., 2004, Leterme et al., 2003, Vertès et

al., 2008). Los coeficientes reales de la reutilización de nitrógeno de la orina por el pasto son de 30 a 65% según los períodos. En prados altamente fertilizados, las pérdidas por lixiviación no superan el 20%, excepto durante el otoño. Las restituciones se distribuyen mejor en el prado, ya que los animales usan toda la superficie de manera homogénea. Pero, la distribución de la orina puede inducir altas concentraciones de nitrógeno a nivel local, lo que aumenta los riesgos de lixiviación (Snow et al., 2009).

3. Comparación de flujos de nitrógeno en algunos sistemas de producción

En los sistemas ganaderos, las emisiones de NH_3 están altamente relacionadas con las emisiones de urea animal, el tipo de estabulación y el almacenamiento de efluentes, lo que influye en la volatilidad del nitrógeno. La eficiencia del uso del nitrógeno por parte de los animales, las estructuras de la cuadra y las técnicas de distribución del estiércol serán los factores de estas emisiones (Reidy et al., 2008).

En estos puntos, los diferentes sistemas de cultivo se destacan de muchas maneras. Simon et al., (2000) y Jarvis et al., (2011) señalarán algunas diferencias importantes entre los sistemas:

- ✓ Los sistemas de cultivos agrarios se caracterizan por altos insumos de fertilizantes y bajas emisiones de amoníaco, vinculados a la baja disponibilidad de nitrógeno amoniacal en los insumos de fertilizantes que se retienen rápidamente a nivel del suelo o son cosechados por el cultivo. El buen uso del nitrógeno por las plantas generalmente permite niveles de excedentes relativamente moderados.
- ✓ En la cría de monogástricos, la mayor parte del aporte del nitrógeno proviene de los alimentos. El segundo elemento es el uso de fertilizantes minerales, aunque inferior que en los sistemas de exclusivamente agrarios, ya que una parte significativa de la fertilización con nitrógeno utiliza el estiércol de ganado. El reciclaje del nitrógeno se limita a la transferencia de materia orgánica de las cuadras a los campos. Un cerdo de engorde que recibe una ración de cereales y harina de soja retiene alrededor del 32% del nitrógeno que ingiere y excreta un promedio de 17% en las heces (Dourmad y Jondreville, 2007). Mitran et al., (2008) evaluaron medidas directas de producción y pérdidas de nitrógeno dentro de una granja de pollos de carne durante todo el ciclo de

producción (42 días). En este estudio, el 99% del nitrógeno entra en forma de alimento y se sale en un 67% en la producción de pollos y el 26% a través de la cama con un 13% en emisiones de gas nitrógeno. La suma supera el 100% debido a la dificultad de medir con precisión los flujos. Neijat et al., (2011) cuantificaron el flujo de nitrógeno para las gallinas ponedoras, con una ingesta promedio de 3 g de nitrógeno por día, del cual el 2% es retenido por la gallina, el 33% exportado en el huevo y el 65% se excreta.

- ✓ Las granjas de rumiantes tienen flujos de nitrógeno muy variables. El equilibrio entre los aportes de nitrógeno por los alimentos comprados, los fertilizantes, y por la fijación simbiótica, está muy relacionado con el modo de producción y el tipo de forraje. Los efluentes contribuyen en gran medida a la fertilización nitrogenada de los cultivos y los prados, y estos a su vez, contribuyen en gran medida a la alimentación de los animales. El suministro externo de nitrógeno en forma de alimentos es mucho más bajo que para las granjas de monogástricos, con excepciones en los sistemas más intensivos, en particular los sistemas lecheros o de cebo de vacuno.

II. Flujos de nitrógeno en la ganadería de bovino

1. Balance de nitrógeno en rumiantes

En rumiantes, la eficiencia del N (expresada como la relación N fijado / N ingerido) es baja y varía en promedio de 0 a 35% según el tipo de producción. Es mínima en animales de mantenimiento, como las vacas secas, varía de 8 a 20-22% en los animales en crecimiento (Marini y van Amburgh, 2005) y en el acabado (Yan et al., 2007), siendo el máximo en vacas en lactación con un rango de 20-35% (Borsting et al., 2003, Nadeau et al., 2007, Peyraud et al., 1995). Como resultado, la mayoría y, a veces todo el N ingerido es excretado por el animal a través de los excrementos (Tabla I.1).

Tabla I.1. Eficiencia del nitrógeno (N) por el ganado bovino según el tipo de producción.

	Vacas carne	Vacas lecheras	Novillas carne	Novillas lecheras
N ingerido (g/d)	240	460	200	180
N fijado (g/d)	40	128	38	20
N total excretado (g/d)	200	332	162	160
Eficiencia (%)	17	28	19	11

Fuente: Peyraud et al., (1995)

En rumiantes en crecimiento o cebo, la cantidad de proteína fijada depende principalmente del tipo de animal (leche o carne) y su edad (Peyraud et al., 1995). En las hembras lecheras, el nitrógeno fijado en la leche depende de la cantidad de leche producida y del contenido de proteína de esa leche. Con una producción anual de 7500 kg de leche, la vaca lechera exporta alrededor de 38,5 kg de N al año. En las ovejas, que producen una leche que es más rica en proteínas, una producción total de 280 kg de leche corresponde a una exportación de 2,4 kg de N. En las cabras, una lactancia de 800 kg de leche corresponde a una exportación de 4,1 kg de N.

El nitrógeno excretado en las heces tiene como origen el nitrógeno dietético no digestible, el nitrógeno microbiano no digerido, la fracción endógena asociada con descamaciones del epitelio intestinal y las secreciones digestivas no absorbidas. Como la digestibilidad verdadera de las proteínas de la dieta es muy alta en rumiantes, la cantidad de nitrógeno fecal no es muy dependiente del contenido de N de la dieta y varía principalmente con las cantidades totales de materia seca de los alimentos ingeridos. Por lo tanto, la cantidad de nitrógeno fecal excretado varía de 7 a 8 g dependiendo de la especie animal (ganado vacuno y ovino) (Lantinga et al., 1987; Peyraud y Astigarraga, 1998). En consecuencia, cualquiera que sea la dieta, el N fecal excretado varía primero con el tamaño y el peso vivo del animal, principal factor de variación de la ingesta y luego, en particular en las vacas lecheras, con el nivel de producción del animal (Edouard et al., 2016, Nennich et al., 2005, Peyraud et al., 1995).

El nitrógeno excretado en la orina es el resultado del catabolismo de las proteínas corporales y el exceso de nitrógeno que proporciona la ración. Su origen nutricional es debido a un exceso de nitrógeno degradable en el rumen que no es empleado por los microbios para su síntesis proteica, o por un exceso de aminoácidos a nivel intestinal absorbido pero no utilizados por el animal (Calsamiglia et al., 2010).

Para calcular el balance diario de nitrógeno, el nitrógeno urinario se determina por la diferencia entre el nitrógeno que se ingiere y la cantidad de nitrógeno que se exporta a la leche o se fija en los tejidos del cuerpo y el nitrógeno fecal, estimado por la cantidad de MS ingerida o medido directamente. Algunos autores han desarrollado ecuaciones de predicción de liberación de nitrógeno que incorporan peso vivo, producción de leche, contenido de nitrógeno y a veces, contenido en fibra neutro detergente (FND) de la dieta (ASAE, 2005; Wilkerson et al., 1997; Yan et al., 2006). Estos autores muestran la importancia del contenido de N en la dieta como variable predictiva, que tiene su gran influencia en la excreción urinaria de nitrógeno. Gracias a estos métodos indirectos de evaluación, es posible calcular a escala de día, mes o año y, según la sucesión de diferentes raciones utilizadas, las cantidades de nitrógeno excretadas por los rumiantes.

2. Factores de variación de la excreción de nitrógeno

a. Influencia del nivel de producción

Todos los autores coinciden en la fuerte y positiva relación entre la cantidad de leche producida durante la lactación y la liberación total de nitrógeno. Borsting et al., (2003) reportan un aumento en el total de N excretado de 14 kg por vaca cuando la producción aumenta de 7000 a 9000 kg de leche. Estos resultados son muy similares a los descritos previamente por Vérité y Delaby, (2000). Según estos autores, un aumento en la producción de 1000 kg de leche aumenta las excreciones anuales de N urinaria en 4,0 kg y de N fecal en 3,3 kg.

b. Influencia del contenido de nitrógeno de la dieta

La naturaleza de la dieta y, en particular, el contenido de N de las raciones influye en la excreción del nitrógeno, especialmente cuando el suministro de nitrógeno degradable en el

rumen, es superior a las necesidades de los microbios y de los animales. El forraje más utilizado, ensilado de maíz, tienen un nivel bajo en nitrógeno (11,2 a 13,8 g N / kg MS) (Agabriel, 2010), lo que implica que, para elaborar raciones bien equilibradas, se precisa la adición adecuada de suplementos proteicos para cubrir las necesidades de los animales. Por el contrario, el pasto verde o las leguminosas (trébol, alfalfa), se caracterizan por niveles de nitrógeno elevados (de 25,6 a 35,2 g / kg MS) que pueden inducir niveles de excreción de nitrógeno más altos (Peyraud et al., 1995). Para compensar este exceso de nitrógeno, muchos estudios han propuesto reducir la proporción de pasto en dietas para rumiantes (Valk, 1994, van Vuuren y Meijs, 1987) que, desde un punto de vista nutricional, es bastante efectivo. Así, cuando, el ensilado de maíz reemplaza el 50% de la hierba del pasto, se reducen las excreciones diarias de nitrógeno en 219 g (de los cuales 212 g son en forma urinaria) (Valk, 1994). No obstante, esta sustitución implica incrementar el uso de suplementos proteicos en la ración y además tiene efectos medioambientales negativos como consecuencia del no uso de superficies pastables.

En una escala anual, al combinar las diferentes secuencias de alimentos, es posible evaluar las excreciones de nitrógeno de un rebaño lechero según la proporción de pasto en la dieta (Delaby et al., 1995). Un ejemplo de un rebaño lechero de 40 vacas (7500 kg de leche) cuyo comportamiento de alimentación varía según el manejo de forraje se presenta en la Tabla I.2.

Tabla I.2. Influencia del sistema de alimentación sobre la deyección del nitrógeno anual de un rebaño de 40 vacas lecheras.

Sistema de alimentación	12 m EM	9 m EM + 3m P	6 m EM y H + 6 m P	6 m EH + 6 m P
N total ingerido (kg)	5246	5705	6439	6715
N de forraje ingerido (kg)	2712	3697	5100	5518
N concentrado ingerido (kg)	2534	2008	1339	1197
N total excretado (kg)	3648	4104	4836	5112
N fecal (kg)	1830	1822	1769	1725
N urinario (kg)	1818	2282	3067	3387
N excretado en cuadra (%)	100	72	53	55
N excretado en el pasto (kg)	0	1140	2280	2280
N usado como fertilizante (kg)	2736	3363	4197	4404
N reciclado por el forraje (%)	99	109	121	125

EM: ensilado de maíz; EH: ensilado de hierba; P: pasto; H: heno; m: meses.

Fuente: Peyraud et al., (1995), Vérité y Delaby, (2000).

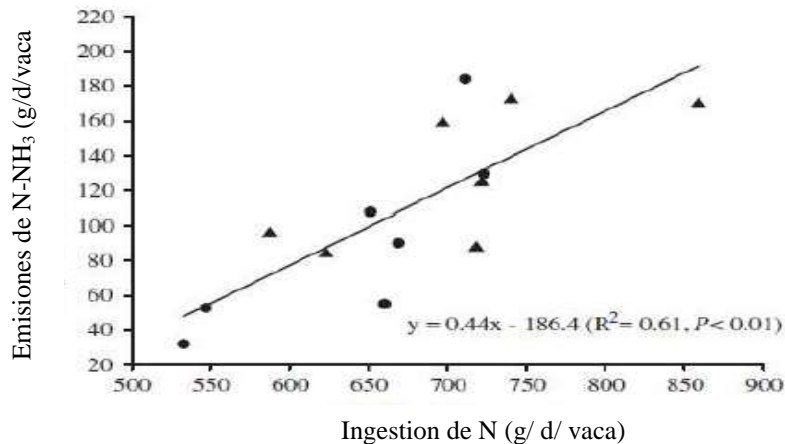
En general, la cantidad de nitrógeno de un rebaño de 40 vacas en forma de purín varía de 3600 a 5100 kg N/año. La proporción del N excretado en la cuadra y reciclado como fertilizante representa entre el 50 y el 100% del total excretado de acuerdo con la proporción de pasto en la ración anual del rebaño. Según lo descrito por Peyraud et al., (1995), la cantidad total de nitrógeno ingerido, aumenta con el aumento de la proporción del pasto. Con una dieta anual de ensilado de maíz, casi el 50% del nitrógeno que consumen las vacas proviene de concentrados que a menudo se importan en forma de harina de soja. Al mismo nivel de producción por vaca, las cantidades de nitrógeno fecal varían poco con la proporción de pasto en la dieta, mientras que las cantidades de nitrógeno urinario varían de 1800 a 3900 kg por año.

3. Factores de variación de las emisiones de amoníaco por el ganado bovino

Las emisiones de amoníaco en la cuadra han sido objeto de muchos trabajos en la cría de ganado bovino. Pero todavía hay mucha incertidumbre porque las medidas se enfrentan a muchas dificultades: primero, la ventilación en los edificios es importante y su estructura compleja, y porque las condiciones no son constantes durante el año. Además, entre los sistemas de producción, existe una gran diversidad de tipos de alojamiento y sistemas de alimentación. Por otro lado, la presencia de animales en las cuadras puede ser discontinua (debido a los períodos de pastoreo) y la temperatura es muy fluctuante (Aguerre et al., 2011). La diversidad de los modos de expresión de las emisiones y los métodos de medición no facilita la comparación de los datos. Sin embargo, la mayoría de los estudios coinciden en que la **dieta** y la **temperatura** son los dos factores principales que promueven la emisión de amoníaco en el alojamiento del ganado.

La cantidad de nitrógeno urinario excretado es el factor principal que afecta las emisiones de amoníaco en los establos y depende especialmente del contenido de proteína en la ración. El contenido de urea de la leche sigue siendo un buen indicador de la excreción urinaria de nitrógeno. Los trabajos de Van Duinkerken et al., (2005) y Van Duinkerken et al., (2011) han desarrollado modelos estadísticos que muestran que las emisiones de amoníaco aumentan en aproximadamente un 3% por cada punto adicional de contenido de urea en la leche (entre 20 y 30 mg de urea / 100 ml).

Aguerre et al., (2010), muestra claramente la importancia de la alimentación en la variabilidad de las emisiones de amoníaco (figura 1) que midieron indirectamente a través del método de balance de nitrógeno. Los niveles muy altos de ingesta de nitrógeno, con raciones con 16 -18% de PB, conllevan a emisiones de amoníaco que multiplican por 4 o 5 las emisiones de estudios con porcentaje moderado de la proteína en la dieta.



Fuente: Aguerre et al., (2010).

Figura 1. Relación entre el nitrógeno ingerido por las vacas lecheras y las emisiones de amoníaco con las dietas siguiendo los estándares americanos de proteína o excedentes.

La temperatura en el alojamiento ganadero es el segundo factor que afecta a las emisiones de amoníaco. La emisión de NH₃ aumenta en un 2,6% para un aumento de temperatura de 1 °C (entre 8 y 25 °C) (Van Duinkerken et al., 2005; 2011). Así, en una misma cuadra y con el mismo método de medición, los autores observan emisiones que varían de 11 a 61 g de nitrógeno amoniacal por vaca y por día.

El tipo de manejo de los animales también afecta a las emisiones. Las emisiones medidas en instalaciones con animales atados y estiércol descargado regularmente en Austria (Amon et al., 2001), Canadá (Bluteau et al., 2009) y EE.UU. (Aguerre et al., 2011) varían de 5 a 20 g de amoníaco por animal por día y son significativamente más bajas que las observadas en cuadras abiertas, donde generalmente están entre 20 y 100 g por vaca por día (Powell et al., 2011).

Las emisiones de N₂O en cuadra todavía son poco conocidas (Arriaga et al., 2010). Los primeros resultados indican emisiones del orden de 0,5 a 0,6 g por vaca y por día (Edouard et al., 2011), siendo preciso confirmar estos valores por otros trabajos.

Por lo tanto, dependiendo de la dieta, la temperatura y los tipos de estabulación, las emisiones de amoníaco por parte de los rumiantes pueden variar considerablemente, especialmente en vacas lecheras alimentadas con dietas muy ricas en nitrógeno. Aunque la

emisión es en promedio cerca del 10% del nitrógeno que se excreta, puede variar considerablemente, desde el 3% (Sommer et al., 2007) hasta casi el 30% con raciones de nitrógeno muy altas (Aguerre et al., 2010). Los métodos y modelos aún deben ser afinados para estimar y predecir mejor estas emisiones, pero está claro que la **dieta** es un factor mayor sobre el cual existen oportunidades de acción.

Sección 3: Requerimientos en proteína, digestión y excreción de nitrógeno por vacas lecheras

I. Necesidades de mantenimiento y de producción de proteína de las vacas lecheras

El objetivo del aporte de la proteína a vacas lecheras es suministrar proteína metabolizable para cubrir las necesidades de mantenimiento y de producción de leche. Los aminoácidos esenciales (AAE) y el nitrógeno (N) se deben absorber en cantidades suficientes en el tracto gastrointestinal para apoyar la síntesis de la proteína de la leche y el mantenimiento de los tejidos corporales en la vaca lactante. Tradicionalmente, los ganaderos lecheros han alimentado a las vacas con dietas con un contenido de proteína bruta más alto de lo que requieren las vacas como estrategia para garantizar un suministro adecuado de proteínas metabolizables y maximizar la producción y la proteína en la leche. La definición de los requisitos de AAE para vacas lecheras es especialmente difícil en comparación con los monogástricos debido al uso de una mayor variedad de productos alimenticios y a la alteración de nutrientes en el rumen por los microorganismos. Se necesita una mejor comprensión de los requisitos de AAE para garantizar la aplicación de dietas bajas en proteínas.

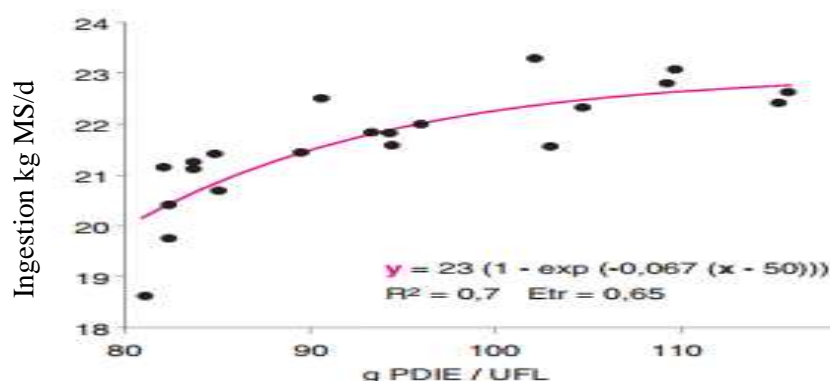
De acuerdo con el sistema de INRA (2007), la necesidad de mantenimiento de PDI se calculó en animales cercanos al mantenimiento y con un balance de nitrógeno cero. Por lo que dependía solo del peso vivo del animal (ganado $3,25 \text{ g PDI} / \text{kg PV}^{0,75}$). Por otro lado, este enfoque ignoró las variaciones en las pérdidas fecales y urinarias endógenas, lo que podría llevar a sesgos significativos relacionados con la subestimación de las necesidades

relacionadas con estos gastos no productivos. Esta estimación se integra en otros sistemas de alimentación, por ejemplo, el de los Países Bajos (Van Duinkerken et al., 2011).

II. Mecanismos del suministro de la proteína sobre la regulación de la ingestión

1. La respuesta de la ingestión proteína

La ingestión de proteína aumenta al aumentar la ingesta de materia seca, pero cuanto más cerca se está de cubrir los requerimientos de proteína del animal, menor es la eficiencia. Una síntesis de las pruebas realizadas en el INRA (Vérité y Delaby, 1998) demostró claramente una respuesta curvilínea a la ingesta de ensilado de maíz ofrecida a voluntad ante un aumento en el contenido de proteínas de la dieta. La ingestión aumenta hasta los 100 g de PDIE / UFL, siendo la respuesta en la ingestión más baja a partir de ese nivel en vacas en la mitad de la lactancia (figura 2).



Fuente: Vérité y Delaby, (1998)

Figura 2. Efecto de la relación entre la proteína y la energía disponible en la dieta sobre la ingestión de materia seca.

La respuesta de la ingestión a los suplementos de proteicos no depende solo de la proteína dietética, también depende en gran medida de otras características de la ración. Ofrecer forraje y concentrados a voluntad (Rico-Gomez y Faverdin, 2001) facilitaría que las vacas aumenten su ingesta que cuando solo el forraje es ofertado a voluntad. A su vez es dependiente de la proporción de concentrado. Por ejemplo, en una ración completa basada

en ensilado de maíz y baja proporción de concentrado (21%), la respuesta de ingestión de materia seca es casi similar al aumento de proteína en la ración (Faverdin et al., 1998). Por el contrario, con la dieta alta en concentrados (40%), la ingesta de alimento continúa aumentando linealmente. Por lo tanto, la ingestión de proteína se incrementaría más fácilmente cuando la dieta tiene una mayor capacidad de ingestión voluntaria.

Algunas materias primas no proporcionan las respuestas esperadas, a pesar de los aumentos significativos en la ingesta de proteínas. El gluten de maíz, rico en proteínas poco degradables, es la materia prima rica en proteínas que más destaca por su efecto negativo en la ingestión (Rico-Gomez y Faverdin, 2001). Su incorporación tiende a reducir significativamente la ingesta de materia seca. La disminución simultánea del suministro de nitrógeno degradable en el rumen, las características altamente acidificantes de este producto y su desequilibrio en los aminoácidos pueden contribuir a este efecto.

2. Mecanismo de regulación

Hay varios mecanismos que explican el efecto de las proteínas sobre la ingestión. El equilibrio de aminoácidos se ha propuesto como clave importante en monogástricos para esta regulación y también puede serlo en rumiantes. Sin embargo, la alta demanda de energía para la síntesis de proteínas es quizás más probable en vacas lecheras. Otras modificaciones, no relacionadas directamente con el metabolismo de los aminoácidos, pero asociadas con las características de los alimentos ricos en proteínas, también pueden estar implicadas en los mecanismos que regulan la ingestión. Por ello, los mecanismos que pueden explicar los efectos de las proteínas en la ingestión han sido mucho menos estudiados en rumiantes que en monogástricos. Algunos aminoácidos son precursores de neuropéptidos involucrados en el control de la ingesta de alimentos. La serotonina parece regular la cantidad de calorías ingeridas y, en algunos casos, la proporción entre proteínas y carbohidratos (Wurtman, 1986). La síntesis de serotonina o 5-hidroxitriptamina (5-HT) se inicia por la hidroxilación de triptófano, uno de los aminoácidos esenciales. La disponibilidad de triptófano para sintetizar serotonina es, por lo tanto, un mecanismo potencial para regular la ingestión.

También es posible que los aminoácidos informen directamente al cerebro de los desequilibrios entre aminoácidos y causen cambios en la ingesta de alimentos (Gietzen, 1993). Este mecanismo no se ha demostrado específicamente en rumiantes porque las proporciones de aminoácidos absorbidos dependen poco de la naturaleza de la proteína, debido a la gran proporción de proteínas microbianas en las proteínas digeribles. En la vaca lechera, las contribuciones complementarias de la lisina y la metionina han sido objeto de numerosas pruebas. Estos dos aminoácidos pueden limitar la síntesis de proteína. Mientras que la infusión de metionina sola nunca aumenta la ingestión, la infusión de lisina (Rulquin y Delaby, 2001) o de lisina y metionina protegidos (Robinson et al., 1995) aumentan rápidamente la ingesta de 0,5 a 1 kg de MS / día cuando la dieta de control es deficiente en lisina. Se pueden obtener bajos niveles de lisina cuando una porción significativa de la proteína en la ración proviene del maíz. La disminución de la ingesta observada con la ingesta de gluten de maíz (Rico-Gomez y Faverdin, 2001) podría explicarse en parte por la aparición de deficiencia de lisina.

La proteína puede actuar regulando el pH en el rumen, y en la sangre. Las materias primas utilizadas para aumentar el suministro de proteína, generalmente torta de leguminosas, a menudo se caracterizan por un balance muy positivo de aniones-cationes que, con dietas ricas en concentrados, puede modificar considerablemente la ingestión en la vaca, en particular al inicio de lactación (Delaquis y Block, 1995).

III. La digestión de la proteína por vacas lecheras

La proteína dietética puede clasificarse como degradable (RDP) o no degradable en el rumen (UDP) en función de su susceptibilidad al ataque microbiano en el rumen. Cuando se alimenta con RDP, la capacidad de síntesis de proteína microbiana depende mucho del suministro de energía de la dieta, independientemente del nivel de proteína bruta de la ración. Esta energía apoya la función de los microbios del rumen, que convierten las fuentes de RDP en proteína microbiana. La proteína microbiana que fluye hacia el intestino, bien como bacterias libres o adheridas a partículas de alimento, constituye una parte importante de la proteína metabolizable disponible para apoyar la síntesis de proteínas de la leche en la glándula mamaria.

La proteína dietética se degrada en el rumen teniendo como producto final el amoníaco (NH_3). Las proteínas de los alimentos se transforman de este modo en aminoácidos (AA) y luego se fermentan hasta la etapa NH_3 , mientras que el nitrógeno no proteico se transforma directamente en NH_3 . Esta degradación genera la producción de una pequeña cantidad de energía. Este amoníaco es utilizado por los microorganismos del rumen para sintetizar sus propias proteínas, llamadas proteínas microbianas. Sin embargo, esta síntesis solo puede tener lugar en presencia de una cantidad suficiente de energía disponible para los microorganismos. Por lo tanto, dos elementos deben estar presentes al mismo tiempo para la síntesis de proteínas microbianas: materiales nitrogenados y energía. Si uno está presente en cantidades más pequeñas que el otro, será el factor limitante y determinará la cantidad de proteína microbiana formada. Para que se utilicen todos los materiales nitrogenados fermentables, es necesario que haya suficiente energía. De lo contrario, el exceso de material nitrogenado se eliminará como NH_3 potencialmente tóxico.

El exceso de NH_3 es absorbido por la pared del rumen y transportado al hígado, donde se convierte en urea. Esta urea se excreta principalmente por la orina y la leche en las vacas lecheras. Sin embargo, también puede regresar al rumen a través de la saliva. La urea también se ha identificado en las secreciones genitales, donde un exceso de urea puede interrumpir la implantación del embrión. En la leche, un exceso puede contribuir a la aparición de mastitis.

Una parte de la proteína dietética resiste a la degradación ruminal ("proteínas de bypass") y pasa al abomaso, donde se degrada enzimáticamente. La resistencia de las proteínas de los alimentos a la acción de los microorganismos del rumen depende de la naturaleza de la proteína. Las proteínas vegetales (como las presentes en los forrajes) son, generalmente muy degradables, mientras que las que han sido sometidas a tratamientos térmicos lo son menos.

IV. Suministro de la proteína en la glándula mamaria

El metabolismo de los rumiantes puede alterar significativamente el suministro de aminoácidos disponibles para la síntesis de proteínas de la leche en la glándula mamaria. Gran parte de la pérdida de nitrógeno en una vaca lechera ocurre en el nivel posterior a la

absorción, una vez que la parte de la proteína metabolizable alcanza el intestino delgado y los aminoácidos se han absorbido hacia la sangre arterial. Una vez absorbidos, los tejidos espláncnicos pueden alterar los aminoácidos individuales desde el catabolismo en el hígado y a las necesidades de los tejidos periféricos, principalmente la glándula mamaria.

El rendimiento de la proteína de la leche es particularmente sensible a la ingesta de los AAE. La glándula mamaria extrae metionina, histidina, triptófano, fenilalanina y tirosina a la misma velocidad que la síntesis de leche. Estos AA son considerados como limitadores potenciales del rendimiento en la síntesis de proteínas de la leche debido a su economía de uso limitado y su alta eficiencia de extracción mamaria. La lisina, treonina y arginina, así como los aminoácidos de cadena ramificada (leucina, isoleucina y valina) son extraídos por la glándula mamaria en más proporción que lo que tienen las proteínas de la leche. Por eso, hay que proporcionar un perfil óptimo de AAE en la dieta, y no un simple aumento en el contenido de proteína dietética, para que se mejore su captación por la glándula mamaria, aumente el rendimiento de proteína de leche y se reduzca el catabolismo del exceso de aminoácidos para minimizar las excreciones de nitrógeno.

V. La excreción del nitrógeno

1. Excreción de N en heces

El N de las heces (N_h) procede de la fracción indigestible de origen dietético y en menor medida, del N de descamación y del N microbiano. La ingestión de 445 g N/d con una dieta basada de ensilado tuvo 156 g N / día en heces o de 9,1 kg N / g MS ingerida (Salcedo, 2006). Otros estudios señalan para vacas lecheras una excreción de 7,5 g N / kg MS ingerida (Peyraud et al., 1995). La excreción de N a través de las heces se puede predecir por su relación lineal con la materia seca ingerida ($-66,58+13,2 \text{ MSI}$; $r^2=0,53$) y el N ingerido (N_i), donde la ecuación de conjunto de dietas es del tipo:

$$N_h \text{ g / d} = -3,29+0,318 N_i; r^2=0,49 \text{ (Salcedo, 2006).}$$

Mulligan et al., (2004) compararon la excreción de N_h y N_i en vacas lecheras alimentadas con pasto con 92 días de leche y suplementadas a dos niveles de concentrado con diferente nivel de proteína, 9,4% PB, 19% PB y 24,2 % PB. Los resultados no mostraron diferencias significativas entre tratamientos con excreción de 132, 154 y 154 g N_h / día y con 144, 152 y 141 g N_i / vaca / día. Sin embargo, los trabajos de Bargo et al., (2002), observaron un aumento de N_h al suplementar la alimentación de vacas lecheras en pastoreo. Edouard et al., (2016), compararon la excreción de N_h de dos niveles de proteína alimentados por vacas lecheras, de baja proteína 12% PB y alta proteína 18% PB. Los resultados tampoco mostraron diferencias significativas, con excreción de 159 g N/d y 163 g N/d respectivamente para dieta de baja proteína y alta proteína.

2. Excreción de N en orina

Cuando el consumo de N es mayor al de energía, la síntesis de proteína microbiana en el rumen se ve limitada, y una parte elevada de N dietético se excreta en heces. Otra parte del amoníaco no utilizado por los microorganismos es excretada a través de la orina en forma de urea. Incrementando el porcentaje de proteína bruta en el concentrado (21 a 29%) de vacas lecheras alimentadas con ensilados de hierba, se obtienen aumentos de 14 y de 74 g/d para N_h y N_o respectivamente. (Castillo et al., 2000).

El sistema de alimentación también afecta la excreción de N en orina (N_o). La mayor excreción de N_o se registró en dietas con pastoreo equivalente a 188 g/d, comparado con 138 g/d en vacas alimentadas con ensilado (Salcedo, 2006). Edouard et al., (2016) mostraron que cuando aumentó el nivel de la proteína en la dieta de 12% a 18% de PB aumenta la excreción del N en la orina de 65 g N / día a 243 g N / día. También, Bahrami-Yekdangi et al., (2014), señalan que cuando sube la concentración de la proteína en la dieta de 15,5% PB a 18% PB, el N_o excretada en la orina aumenta también de 281,3 g N / día a 339,2 g N / día.

3. Excreción de N en la leche

En los sistemas intensivos y semi-intensivos de producción de leche, mantener la concentración de la proteína de la leche es un problema no resuelto. Se ha cuantificado una excreción de N en la leche (N_l) de 84,3 g / día con dietas con ensilados y de 101 g/d con pastoreo con una proporción de proteína en la leche de 3,03 % y 3,12 % respectivamente (Salcedo, 2006). En dietas con ensilado de hierba con un 12,3% de proteína bruta y suplementadas con concentrados de diferentes niveles (21 y 29% PB), se obtienen respuestas de 3,16 g / N_l / unidad porcentual de PB, sin observar efectos significativos (Castillo et al., 2000).

VI. Eficiencia del uso del nitrógeno por vacas lechera

La eficiencia del uso de nitrógeno (EN) de la ración se define como el porcentaje de nitrógeno recuperado en la leche respecto al ingerido. Los efectos de la suplementación en la mejora de la EN, están bien documentados. Una suplementación de 2 kg de soja, aumenta ligeramente la producción de leche, pero disminuye la eficiencia de N un 6%. Esta reducción es resultado de una mayor excreción de N en la orina (Astigarraga et al., 1993). Similares efectos son observados cuando las vacas son alimentadas con ensilados de hierba, suplementados a diferentes niveles de proteína y degradabilidad ruminal donde la EN disminuye cuando se incrementa la proteína de la dieta y su degradabilidad, sin efectos en la producción o su contenido proteico de la leche (Castillo et al., 2000). Broderick et al., (2003) señalan que cuando disminuye la concentración de la proteína dietética de 18,6% a 15%, la EN aumenta de 26,2% a 34%.

Para estimar la eficiencia de uso del nitrógeno se han publicado múltiples ecuaciones para relacionar la EN con el N ingerido (N_i) y la excreción de N en orina (N_o), como los indicados a continuación:

$$EN (\%) = 37,1 + 0,00048 N_i \text{ g/d}; r^2 = 0,59 \text{ (Salcedo, 2006).}$$

$$EN (\%) = 37,1 - 0,058 N_o \text{ g/d}; r^2 = 0,59 \text{ (Salcedo, 2006).}$$

Sección 4: Estrategias para reducir la emisión del nitrógeno al ambiente

I. Gestión de la alimentación y mejora de la eficiencia alimentaria del nitrógeno

La gestión de la alimentación es un componente muy estudiado. Cualquier exceso de alimento, nitrógeno degradable en el rumen o de aminoácidos en el intestino se excretará como urea, lo que aumentará el riesgo de emisiones de NH_3 . Por lo tanto, se debe utilizar el conocimiento nutricional para gestionar la alimentación de los rumiantes para reducir los excesos sin afectar el rendimiento zootécnico.

Algunos cambios en la dieta del ganado pueden reducir o limitar la excreción del exceso de nitrógeno en el estiércol. La eficiencia de la granja lechera también se mide por su control de las pérdidas de nitrógeno. Por lo tanto, los esfuerzos para manejar el exceso de nutrientes en la granja lechera pueden aumentar la eficiencia del uso de nitrógeno en la dieta (ILFA, 2008). Cuanto más nitrógeno retiene la leche, menos se pierde en los excrementos y más eficiente es el uso del nitrógeno consumido. Además, la reducción de las emisiones de nitrógeno es una ganancia para el agricultor a nivel ambiental y económico. Primero, el agricultor no tiene que pagar por la compra de fertilizantes químicos. En segundo lugar, se reduce la pérdida de nitrógeno que se transforma en N_2O , un potente gas de efecto invernadero (GEI). Cada kilogramo de nitrógeno contenido en el estiércol genera una emisión directa de 4,9 kg de CO_2 en forma de N_2O . El estiércol también genera emisiones indirectas de N_2O , relacionadas con las pérdidas de nitrógeno que se producen como resultado de la aplicación de la tierra. Al reducir las cantidades de proteína bruta en la dieta, es posible reducir las pérdidas de nitrógeno en la orina. Estas pérdidas se transforman rápidamente en NH_3 , un gas volátil presente en la lluvia ácida y generador de olores. Por lo tanto, es muy interesante reducirlos para reducir el impacto ambiental del NH_3 . También puede ser ventajoso alimentar las vacas lecheras con aminoácidos limitantes, como lisina y metionina, ya que reducen el nivel de proteína bruta en la dieta. Agregar estos AA para equilibrar las raciones de aminoácidos en la dieta basal ayuda a alcanzar los requisitos de proteína de los animales con mayor precisión. Además, es una ganancia de energía para las vacas, porque eliminar el exceso de nitrógeno requiere

un gasto de 7 kcal / kg de nitrógeno, lo que puede llevar a la pérdida de peso en el animal. Eliminar el exceso de nitrógeno de las raciones también puede tener un impacto en la salud del ganado. El exceso de nitrógeno en el rumen, en forma de NH_3 , se transfiere a la sangre y se libera rápidamente por los riñones, siendo el NH_3 altamente tóxico para el animal.

II. Gestión del purín como fertilizante

1. Cubrir la fosa de almacenamiento del purín

Cubrir la fosa es una de las prácticas que conservan el nitrógeno en la granja. De hecho, los techos reducen las pérdidas anuales de nitrógeno amoniacal (NH_3) por la volatilización entre un 10 y un 20%, y hasta un 90% en verano (FPPQ, 2007). Aunque el amoníaco no es un GEI, causa lluvia ácida, contribuye a la formación de aerosoles y a la pérdida de biodiversidad en entornos sensibles. Además, el nitrógeno que se volatiliza genera emisiones indirectas de N_2O , es decir, fuera de la granja de origen, cuando se vuelve a depositar en el suelo. Estas emisiones siguen siendo parte del balance de GEI de la granja.

2. Modificar el modo de aplicación de purines como fertilizantes

Para aumentar la eficiencia del reciclaje de nutrientes y reducir las emisiones de GEI en la granja, es primordial un óptimo uso del nitrógeno orgánico. El contenido de nitrógeno del estiércol animal influye en las emisiones en el campo. A lo largo de todas las etapas del manejo del estiércol, el nitrógeno presente tiene varias oportunidades para perderse, especialmente en forma de amoníaco (NH_3). Parte de la pérdida de nitrógeno se convierte de nuevo en óxido nitroso (N_2O), un gas, con 310 veces más de poder calórico que el CO_2 .

El equipo utilizado para aplicar el estiércol tiene un impacto en la volatilización del nitrógeno. Cuanto más tiempo esté purín en contacto con el aire, mayor será la volatilización. La pulverización aerodinámica baja divide el purín en gotas finas, que favorece la pérdida de nitrógeno amoniacal en la atmósfera (FPPQ, 2005). Los tubos de inyección o colgantes, sin embargo, evitan esta desventaja, permitiendo conservar mejor el nitrógeno en el campo y, por lo tanto, reducir los riesgos de emisiones indirectas de N_2O . La rápida incorporación al suelo de materiales fertilizantes, así como la maquinaria para

aplicarlo más cerca del suelo, son elementos que reducen las emisiones de N_2O y la lixiviación de N. De hecho, dentro de las 10 horas posteriores a la aplicación, el purín que queda en la superficie puede perder hasta el 50% del nitrógeno amoniacal que contiene (Rochette, 2008). Estas pérdidas deben ser compensadas por la compra de fertilizantes químicos. La aplicación cercana al suelo, limita las pérdidas de amoníaco a menos del 5% (Vanasse, 2004). Lo ideal es incorporar el purín evitando colocarlo debajo de las raíces, para incorporarlo en los primeros 5 a 10 cm del suelo (Vanasse, 2004).

Algunos consejos prácticos para reducir la volatilización del nitrógeno cuando se aplica la fertilización con el purín (Gasser y Cassier, 2008, PAGES, 2005) serán los siguientes:

- ✓ Incorporar el estiércol rápidamente.
- ✓ Ajustar las dosis de estiércol a las necesidades de plantas.
- ✓ Aplicar el purín en suelo seco, siempre que posible.
- ✓ Disminuir la altura de la aplicación del estiércol.
- ✓ Hacerlo en un clima fresco, por la tarde o por la mañana. La alta temperatura favorece la volatilización de NH_3 .
- ✓ Calcular la mejor dosis del estiércol para que ser utilizado por las plantas.

3. Utilizar el separador de fases de purín

La separación de fases proporciona dos productos que pueden administrarse de manera diferente y potencialmente mejor:

- ✓ Una fase sólida con concentraciones totales de nitrógeno y fósforo, 2, y de 4 a 5 veces más altas que las del producto inicial y una fase líquida (menos del 2% de MS) con nitrógeno esencialmente en forma amoniacal (85%) (Béline et al., 2003).
- ✓ El separador separa el purín en dos fases: líquida (FL) y sólida (FS). El fósforo (P) se concentra en la parte sólida del purín (75 a 90% de P). La FS puede estar condicionada, mejorando su estado físico, conservando los nutrientes y reduciendo los patógenos, los olores y la densidad (Martin et al., 2008). La FL tiene una baja concentración en fósforo y rica en nitrógeno. La FL puede aplicarse más fácilmente

a suelos ricos en fósforo y proporcionar algunos de los minerales esenciales a las plantas, o incluso cumplir con los requisitos de nitrógeno (Martin et al., 2008).

Materiales y métodos

Parte 2: Materiales y métodos

I. Presentación general del ensayo

El ensayo fue realizado con la autorización de la Consejería de Desarrollo Rural y Recursos Naturales de Principado de Asturias tras el informe favorable del Comité Ético de Experimentación Animal de la Universidad de Oviedo (Nº expediente PROAE 26/2018).

1. Animales

Los animales fueron elegidos de acuerdo al momento de lactación y al número de partos. Se utilizaron 6 vacas lecheras Holstein en el primer tercio de lactación que fueron alojadas en 6 jaulas metabólicas con comedero y bebedero individual. Al inicio del experimento, el peso medio de las vacas fue de $677 \pm 45,86$ kg, con un índice de estado corporal de $2,71 \pm 0,43$ (escala 1 a 5), una producción diaria de leche de $35,44 \pm 6,38$ kg y con $2,83 \pm 0,61$ partos.

2. Alimentación

La dieta se ofreció *ad libitum* como una ración completa mezclada (TMR), distribuida individualmente dos veces al día. Los animales se alimentaron, con las cantidades distribuidas ajustadas día a día de acuerdo con la ingesta del día anterior, para que los rechazos fueran inferiores al 10%. Durante los ordeños, se distribuyó una cantidad de concentrado con el fin de mantener a las vacas tranquilas durante el ordeño y alcanzar los niveles de PB previstos.

Se elaboran tres raciones con alto (AP), medio (MP) y bajo nivel de proteína (BP). La composición de las raciones y su valor nutricional se presentan en la Tabla II.1.

Tabla II.1. Composición de las raciones.

	AP	MP	BP
Ingredientes (kg MS)			
Ensilado de hierba	6,54	6,54	6,54
Paja de cereal	1,43	3,80	3,80
Alfalfa	2,73	1,37	1,37
Concentrado	7,17	7,35	7,35
Harina de colza*	0	1,79	0
Lactomezcla1*	2,66	0	0
Lactomezcla K*	0	0,90	2,51

AP: Alta proteína, tratamiento; MP: Media proteína, tratamiento; BP: Baja proteína; MS: materia seca.

*: Distribuidos en el momento del ordeño.

II. Medidas y muestreos

El ensayo se realizó siguiendo un doble cuadrado latino de 3 x 3, en tres periodos consecutivos, de modo que cada pareja de vacas recibió secuencialmente todos los tratamientos. La duración de los periodos fue 14 días, con 10 días de adaptación a la dieta y cuatro días de mediciones. Todas las medidas fueron realizadas individualmente. Para cada vaca, se midió la cantidad de materia seca ingerida, la cantidad diaria de leche producida, su composición química, la excreción de heces y orina, y sus composiciones. Los animales se pesaron al inicio de cada periodo experimental.

1. Alimentos

La oferta y rechazo de la ración se pesó diariamente. Durante los días de muestreo, se tomó una alícuota de 500 g cada ración recién elaborada. Las muestras fueron congeladas hasta el final del periodo de muestreo. Tras su descongelación, las muestras correspondientes a cada tratamiento fueron agrupadas, homogenizadas y muestreadas con el fin de obtener una única muestra de alimento por tratamiento y por periodo. Los rechazos de cada animal fueron muestreados y congelados hasta el fin del periodo de muestreo. Tras el cual fueron

descongelados, agrupados por animal y tratamiento y muestreados para tener una muestra por animal y periodo.

Las muestras de alimentos y rechazo fueron secadas en estufa de aire forzado a 60°C durante 24 horas para determinar el contenido de MS (de la Roza et al., 2002) y posteriormente fueron molidas a un tamaño de 0,75 mm de diámetro para el análisis de cenizas (CEN), proteína bruta (PB), grasa bruta (EE), fibra bruta (FB), fibra neutro detergente (FND), fibra ácido detergente (FAD), almidón (ALM), nitrógeno ligado a la FAD (N-FAD), fósforo (P) y potasio (K).

Todas las muestras de los alimentos (TMR, lactomezclas y rechazo) 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), mediante espectroscopia en el infrarrojo cercano (NIR), utilizando un equipo NIRSystem 5000 para los parámetros analíticos indicados exceptuando P y K para los que el laboratorio no dispone de ecuaciones de predicción NIR. En algunas muestras de rechazo en las cuales los controles de calidad no garantizaron su exactitud en el análisis NIR, fueron analizadas por vía húmeda mediante fraccionamiento Weende (AOAC, 1984) y Van Soest (Van Soest et al., 1991).

El contenido en fósforo (P) se determinó por espectroscopia UV-Vis. Para determinar el P, se pesan 2,5 g de muestra, se mezclan con 1 g de carbonato cálcico y a continuación se incinera en horno mufla a $500 \pm 15^\circ\text{C}$ durante 4 horas. Después de enfriar, se añade 10 ml de H₂O destilado de tipo 2 y 10 ml de HCl (37% v/v) y se pone a evaporar sin llegar a la ebullición. Una vez seco, se deja enfriar el residuo y se redisuelve con 10 ml de ácido nítrico al 10%. Se lleva a ebullición suave 8-10 min, sin que se seque y se deja a enfriar. El residuo se filtra y se lleva a un volumen final de 250 ml. Se pipetea 1 ml de las muestras del ensayo y se añade a cada tubo 5 ml del reactivo de color (solución de nitro molibdeno vanadato). En cada tanda de análisis se incluye un tubo para blanco con 1 ml de agua destilada. Se elabore una recta de calibración con patrones de P a dilución (15, 20, 50, 75, 100 ppm). Al final, se toman las lecturas fotométricas a 430 nm en espectrofotómetro de marca PerkinElmer.

El contenido de potasio (K) fue analizado externamente en los laboratorios de Análisis de Calidad (Burgos). Para ello, se realizó una digestión ácida de las muestras en microondas siguiendo el método oficial AOAC 999.10. La cuantificación del K se realizó por absorción atómica mediante atomización en llama de aire/acetileno.

2. Producción y composición de la leche

La producción de leche se pesó diariamente. Durante los días 1 y 3 de muestreo, se tomó una muestra de 50 ml de leche por cada vaca en los ordeños de la mañana y la tarde. Las muestras de cada día y cada vaca se agruparon proporcionalmente a la producción de cada ordeño en botes con Azidol como conservante. Las muestras fueron enviadas al Laboratorio Interprofesional Lechero y Agroalimentario de Asturias (LILA) para sus análisis de grasa (%), proteína (%), lactosa (%), extracto seco magro (%), células somáticas (x1000/ml) y urea (mg/l) mediante MilkoScan FT6000.

3. Excreción de heces y orina y sus análisis

Las heces se recogieron en cajones adosadas a cada jaula metabólica durante los 4 días de muestreo (foto 1). Se pesó la producción diaria total de heces excretadas, tomándose una muestra del 2% de la excreción total de cada animal, que fue congelada hasta el final de cada periodo. Al finalizar, las muestras fueron descongeladas, homogenizadas y se tomó una muestra final por cada animal y periodo para su procesado y análisis de laboratorio.

En el día 7 de adaptación, se colocaron a los animales los arneses colectores de orina adheridos a la región perivulvar (foto1) para que se adaptaran a los mismos. La orina fue recolectada en bidones que contenían 1 litro de ácido sulfúrico al 10% para evitar las pérdidas del amoníaco. Diariamente se pesó la producción total de orina. La densidad y el pH de la orina fueron medidas inmediatamente y se tomó una muestra del 1% de la producción total por cada animal. Las muestras fueron congeladas hasta su análisis.



Foto 1. Sistema de recolección de heces y orina.

3.1 Análisis de composición química de heces

La determinación de $N-NH_3$ se realizó mediante alcalinización de las muestras con óxido de magnesio. El amoníaco presente en la muestra es destilado, recogido en una solución receptora y valorada. Para el análisis, se utilizaron 10 g de heces frescas a los que se añadieron 10 ml de óxido de magnesio diluido al 10% (v/v) y 75 ml de agua destilada. Los resultados obtenidos de la valoración fueron expresados en $mg N-NH_3/100 g$ de heces.

Tras al análisis de NH_3 , las heces fueron secadas a $60^\circ C$ durante 48-72 horas hasta peso constante y posteriormente molidas a 1 mm para determinar su composición química por vía húmeda. El contenido en MS y cenizas se determinó por desecación a $103^\circ C$ en atmosfera de N_2 hasta peso constante, seguida de incineración a $550^\circ C$ en atmosfera de O_2 hasta peso constante en termo-balanza TGA601 de Leco. El contenido de PB se calculó a partir del nitrógeno ($N \times 6,25$) determinado mediante el método kjeldahl (kjeltec 8400 de tecator). El contenido de EE fue determinado, tras una hidrolisis previa de la muestra con ácido clorhídrico 3M, por extracción en un equipo 2050 Soxtec Avanti (FOSS Tecator Hillerod Dinamark) utilizando éter de petróleo como solvente orgánico. Los contenidos en FND y FAD fueron determinados de acuerdo con la metodología de Van Soest et al., (1991) para el fraccionamiento de la fibra utilizando un equipo Fibertec 5020 Hot Extractor

Analizar de Tecator FOSS Electronic A/S Hillerod, Dinamarca. El N-FAD se determinó a partir del nitrógeno del residuo de extracción de FAD mediante el método Kjeldahl.

3.2 Análisis de N-NH₃ y N-Total de la orina

La determinación de N-NH₃ se realizó mediante alcalinización de las muestras de orina con óxido de magnesio. El amoníaco presente es destilado, recogido en una solución receptora y valorada. Para el análisis, se utilizaron 20 ml de orina a los que se añadieron 10 ml de óxido de magnesio diluido al 10% (v/v) y 75 ml de agua destilada. Los resultados obtenidos de la valoración fueron expresados en mg N-NH₃ / 100 ml de orina.

El análisis de N-Total se realizó el método Kjeldahl digiriendo 5 ml de muestra de orina a los que se añadieron 25 ml de agua oxigenada a cada tubo para evitar la formación de espumas y la consiguiente pérdida de muestra. La destilación fue valorada en equipo de destilador de proteína 1035+1038 de Tecator.

3.3 Análisis de fósforo (P) de heces y orina

Los análisis de fósforo de las heces se realizaron según el mismo procedimiento descrito en la parte de análisis de alimentos. Para el análisis de P en orina, las muestras de orina fueron sometida a un proceso de liofilización que consiste a eliminar el agua de la orina en condiciones de baja presión y baja temperatura lo que favorece que la orina deshidratada mantenga todas sus propiedades estables. Al suministrar calor, el hielo pasa de su fase sólida a la gaseosa, sin alcanzar el punto de ebullición del agua, y se evita el paso por la fase líquida. Al final de la liofilización, se pesó el residuo sólido de orina para determinar su contenido en materia seca (% MS). Posteriormente, se utilizó el residuo seco para la determinación de fósforo (% P) con la misma metodología descrita pero diluyendo a un volumen final de 50 ml para que los resultados estuvieran dentro de la curva de calibración.

3.4 Análisis de potasio (K) en heces y orina

Las muestras de heces secas y orina liofilizada fueron enviadas al Laboratorio de Análisis de Calidad (Burgos) para su determinación de K con el mismo procedimiento descrito para los alimentos.

III. Diseño experimental, cálculos y análisis estadísticos

El ensayo se llevó a cabo siguiendo un diseño de doble cuadrado latino 3 x 3. El ensayo realizado para evaluar la incidencia del nivel de proteína en la ración, se realizó en 3 periodos de 14 días, con 10 días de adaptación y 4 días de muestreo. Las 3 parejas de animales se rotaron de manera que al final de los 3 periodos de ensayo todos los animales recibieron las tres diferentes raciones como se muestra la tabla II.2.

Tabla II.2. Esquema de distribución de raciones unifeed a los tres grupos de animales durante los tres periodos del ensayo.

	ALTA PROTEINA		MEDIA PROTEINA		BAJA PROTEINA	
Periodo1	Vaca 1	Vaca 2	Vaca 3	Vaca 4	Vaca 5	Vaca 6
Periodo 2	Vaca 5	Vaca 6	Vaca 1	Vaca 2	Vaca 3	Vaca 4
Periodo 3	Vaca 3	Vaca 4	Vaca 5	Vaca 6	Vaca 1	Vaca 2

La ingestión (kg/d) en materia seca (MS), materia orgánica (MO), proteína bruta (PB), almidón (ALM), extracto etéreo (EE), fibra neutro detergente (FND), fibra ácido detergente (FAD), nitrógeno ligado a la FAD (N-FAD), fósforo (P), potasio (K) y su concentración en energía metabolizable (EM) y energía neta de lactación (ENL) fue calculada según la ecuación siguiente:

$$\text{Ingestión (kg/d)} = \left(MS \text{ ofertada} \times \frac{\% \text{ nutriente}}{100} \right) - \left(MS \text{ rechazo} \times \frac{\% \text{ nutriente}}{100} \right)$$

La digestibilidad aparente (%) fue estimada a partir de la ecuación siguiente:

$$\text{Digestibilidad aparente (\%)} = \frac{\text{nutriente ingerido} - \text{nutriente en heces}}{\text{nutriente ingerido}} \times 100$$

La materia orgánica digestible (MOD, kg/d) fue estimada según esta ecuación:

$$\text{MOD (kg/d)} = \frac{\text{MO ingerida} \times \text{DMO}}{100}$$

Siendo la digestibilidad de la materia orgánica (DMO) estimada según Riveros y Argamentaría, (1987).

Los resultados de ingestión de alimento, producción de leche y su composición, de excreción de heces y orina y sus composiciones en N, P y K fueron analizados mediante un análisis de varianza utilizando un modelo mixto considerando la dieta como efecto fijo y el periodo y la vaca como efectos aleatorios, utilizando el software Infostat, 2018 según el siguiente modelo:

$$\mathbf{Y_{ijk} = m_0 + T_i + P_j + A_k + e_{ijk}}$$

Y_{ijk}: variable dependiente;

m₀: media global;

T_i: efecto de tratamiento considerando como tal los 3 niveles de proteína de la dieta (17%; 15%; 13%) (n = 3);

P_j: efecto de periodo (p = 3);

A_k: efecto de pareja de vacas (q = 3);

e_{ijk}: error estándar del tratamiento i, periodo j y pareja k.

Resultados

Parte 3: Resultados

I. Ingestión de las dietas

En la tabla III.1 y III.2, se muestra el valor nutritivo de las raciones ofertadas y del rechazo. Los valores de proteína degradable y no degradable en el rumen de las raciones ofertadas fueron estimados a partir de las tablas del NRC (2001). En la estimación de la composición de las raciones a partir de los análisis del valor nutritivo de los ingredientes realizados previamente, la proporción de PB para las raciones AP, MP y BP era respectivamente del 17%, 15% y 13%. Sin embargo, tras los análisis de las muestras del ensayo, las raciones MP y BP resultaron con un punto porcentual más de lo esperado con un 16,5% y 14,8% respectivamente. Este hecho posiblemente fue debido a la gran variabilidad en el contenido en PB entre las rotopacas de ensilado de hierba de prado utilizado.

Tabla III.1. Valor nutritivo de las raciones ofertadas.

	AP	MP	BP
MS	42,27	47,32	45,48
MO	90,83	90,87	90,91
PB	17,28	16,53	14,83
RDP	96,54	94,34	85,65
UDP	77,44	73,69	65,58
ALM	18,72	14,41	15,64
EE	2,86	2,46	2,36
FND	36,81	44,26	41,79
FAD	22,97	28,54	26,75
N-FAD	2,25	5,26	4,26
P	0,74	0,75	0,74
K	0,02	0,02	0,02
ENL	1,78	1,91	1,91
EM	9,99	9,50	9,27

AP: Alta proteína; MP: Media proteína; BP: Baja proteína; MS: materia seca (%); MO: materia orgánica (% MS); PB: proteína bruta (%MS); RDP: proteína degradable en el rumen (%MS); UDP: proteína no degradable en el rumen (%MS); ALM: almidón (%MS); EE: extracto etéreo (%MS); FND: fibra neutro detergente (%MS); FAD: fibra ácido detergente (%MS); N-FAD: nitrógeno ligado a la FAD (%MS); P: fósforo (%MS); K: potasio (%MS); ENL: energía neta de lactación (Mcal/kg MS); EM: energía metabolizable (MJ/kg MS).

Tabla III.2. Valor nutritivo del rechazo.

	AP	MP	BP
MS	40,17	37,15	40,06
MO	88,54	87,22	86,64
PB	14,75	14,27	13,45
ALM	11,88	10,22	10,90
EE	3,03	2,68	2,58
FND	44,36	48,09	42,83
FAD	29,33	29,90	29,33
N-FAD	1,08	1,15	1,08
P	0,32	0,33	0,33
K	0,02	0,02	0,02
ENL	1,43	1,40	1,39
EM	9,56	9,39	9,28

AP: Alta proteína; MP: Media proteína; BP: Baja proteína; MS: materia seca (%); MO: materia orgánica (%MS); PB: proteína bruta (%MS); ALM: almidón (%MS); EE: extracto etéreo (%MS); FND: fibra neutro detergente (% MS); FAD: fibra ácido detergente (%MS); N-FAD: nitrógeno ligado a la FAD (%MS); P: fósforo (%MS); K: potasio (%MS); ENL: energía neta de lactación (Mcal/ kg MS); EM: energía metabolizable (MJ/ kg MS).

En la tabla III.3 se muestra la ingestión y el rechazo en materia seca (MS), materia orgánica (MO), proteína bruta (PB), almidón (ALM), extracto etéreo (EE), fibra neutro detergente (FND), fibra ácido detergente (FAD), nitrógeno ligado a la FAD (N-FAD), fósforo (P), potasio (K) y su concentración en energía metabolizable (EM) y energía neta de lactación (ENL).

Se observó que la ingestión en MS, MO, PB, FND y FAD fueron similares entre los tratamientos ($P > 0,05$). (Tabla III.3). Con la dieta de media proteína hubo una mayor ingestión de N-FAD (1,12 kg/d) que en la alta proteína (0,46 kg / día) y la baja proteína (0,58 kg / día). Las ingestiones de ALM y EE difirieron entre dietas, siendo significativamente mayores en la dieta de alta proteína ($P < 0,05$). Esta diferencia de energía de EE indujo que el contenido energético de la ración ingerida de alta proteína fuera mayor ($P < 0,05$) que en los otros tratamientos (10,13 MJ de EM / kg MS vs 9,84 y 9,81 MJ de EM / kg MS y 1,52 Mcal de ENL / kg MS vs 1,47 y 1,47 Mcal de ENL / kg MS

para las dietas AP, MP y BP respectivamente). Las vacas ingirieron de media 150 g/d de P y 3,77 g/d de K.

Tabla III.3. Ingesta y rechazo de los nutrientes por las vacas lecheras alimentadas con diferentes concentraciones de proteína bruta.

	AP	MP	BP	E.E	Sig
Ingestion					
MS (kg/d)	20,78	20,92	19,71	1,206	ns
MO (kg/d)	18,51	18,50	17,46	1,090	ns
PB (kg/d)	3,28	3,35	2,86	0,181	ns
ALM (kg/d)	3,29 ^a	2,64 ^b	2,32 ^b	0,196	*
EE (kg/d)	0,70 ^a	0,62 ^{ab}	0,65 ^b	0,034	*
FND (kg/d)	8,81	9,54	8,97	0,581	ns
FAD (kg/d)	5,26	5,89	5,51	0,386	ns
N-FAD (kg/d)	0,46 ^a	1,12 ^b	0,58 ^c	0,026	*
P (g/d)	151,41	155,78	143,25	16,444	ns
K (g/d)	4,00	3,75	3,56	0,245	ns
EM (MJ/kg MS)	10,13 ^a	9,84 ^b	9,81 ^b	0,068	*
ENL (Mcal/kg MS)	1,52 ^a	1,47 ^b	1,47 ^b	0,011	*
Rechazo					
MS (kg/d)	0,54	0,67	0,61	0,303	ns
MO (kg/d)	0,48	0,59	0,53	0,269	ns
PB (kg/d)	0,08	0,09	0,08	0,041	ns
ALM (kg/d)	0,07	0,06	0,06	0,030	ns
EE (kg/d)	0,02	0,02	0,02	0,008	ns
FND (kg/d)	0,25	0,32	0,22	0,127	ns
FAD (kg/d)	0,16	0,20	0,18	0,093	ns
N-FAD (kg/d)	0,01	0,01	0,01	0,003	ns
EM (MJ/kg MS)	5,15	6,30	5,63	2,850	ns
ENL (Mcal/kg MS)	0,77	0,94	0,84	0,426	ns

AP: alta proteína; MP: media proteína; BP: baja proteína; MS: materia seca (kg/d); MO: materia orgánica (kg/d); PB: proteína bruta (kg/d); ALM: almidón (kg/d); EE: extracto etéreo (kg/d); FND: fibra neutro detergente (kg/d); FAD: fibra ácido detergente (kg/d); N-FAD: nitrógeno ligado a la FAD (kg/d); P: fósforo (g/d); K: potasio (g/d); EM: energía metabolizable (MJ/ kg MS)); ENL: energía neta de lactación (Mcal/ kg MS); E.E: error estándar; Sig: significancia; ns: no significativo (P > 0,05); *: significativo (P < 0,05).

II. Producción de leche y su composición química

La producción de leche y su contenido en materia grasa (%), proteína (%), lactosa (%), sólidos no grasos (SNG %), células somáticas (SSC células /mL x 1000) y urea (mg/L) están presentadas en la tabla III.4.

Tabla III.4. Producción y composición de la leche según el nivel de proteína de la dieta.

	AP	MP	BP	E.E	Sig
Leche (kg/día)	32,99	31,87	30,76	2,571	ns
Grasa (%)	4,14	4,11	4,27	0,237	ns
Proteína (%)	2,98	2,95	2,90	0,038	ns
Lactosa (%)	4.46	4.24	4.07	0,354	ns
SNG (%)	7,79	7,13	7,13	0,706	ns
SSC (células/ mL x 1000)	376,82	32,85	102,31	168,45	ns
Urea (mg/L)	236	270	160	49,846	ns

AP: alta proteína, MP: media proteína, BP: baja proteína, SNG: sólidos no grasos (%); SSC: células somáticas; E.E: error estándar. Sig: significancia; ns: no significativo ($P > 0,05$).

La producción de leche y su contenido no presentaron diferencias significativas entre tratamientos ($P > 0,05$). No obstante, la producción de leche disminuyó numéricamente en aproximadamente 1 kg por cada nivel de bajada de proteína. Estas diferencias se mantienen cuando la producción de leche esta corregida por proteína y energía con unos valores de 32,7; 31,4 y 30,9 kg/d respectivamente.

III. Excreción de N, P, K en heces

En la tabla III.5 se muestra la composición de las heces según el nivel de proteína en la dieta. La tabla III.6 muestra la cantidad de heces excretada en materia seca (MS), materia orgánica (MO), proteína bruta (PB), fibra neutro detergente (FND), extracto etéreo (EE),

Así como el efecto del nivel de proteína en la dieta sobre la excreción de nitrógeno amoniacal (N-NH₃) y total (N-Total), fósforo (P) y potasio (K).

Tabla III.5. Composición química de las heces según el nivel de proteína en la dieta.

	AP	MP	BP
MS	13,16	12,80	12,90
MO	81,38	82,11	81,61
PB	16,02	14,86	14,31
N-NH₃/N-Total	8,20	6,38	7,77
FND	54,72	57,26	56,93
EE	2,01	1,74	1,43
P	0,54	0,58	0,50
K	0,01	0,01	0,01

AP: alta proteína; MP: media proteína; BP: baja proteína; MS: materia seca (%); MO: materia orgánica (%MS); PB: proteína bruta (%MS); N-NH₃/N total: nitrógeno amoniacal sobre nitrógeno total; FND: fibra neutro detergente (%MS); EE: extracto etéreo (%MS); P: fósforo (%MS); K: potasio (%MS).

Tabla III.6. Excreción total de heces y cantidad diaria excretada según su composición.

	AP	MP	BP	E.E	Sig
Excreción de heces (kg MS/d)	8,97	9,25	8,88	0,586	ns
MO (kg/d)	7,43	7,67	7,38	0,511	ns
PB (kg/d)	1,43	1,37	1,27	0,089	ns
FND (kg/d)	5,30	5,06	4,92	0,343	ns
EE (kg/d)	0,18 ^a	0,16 ^{ab}	0,13 ^b	0,019	*
N-NH₃ en heces (g/d)	18,22	13,77	15,95	4,542	ns
N-Total en heces (g/d)	229,58	219,36	203,19	14,231	ns
P (g/d)	49,11	53,10	44,72	4,144	ns
K (g/d)	0,809	0,769	0,836	0,105	ns

AP: alta proteína; MP: media proteína; BP: baja proteína; MS: materia seca (kg/d); MO: materia orgánica (kg/d); PB: proteína bruta (kg/d); FND: fibra neutro detergente (kg/d); EE: extracto etéreo (kg/d); N-NH₃: nitrógeno amoniacal (g/d); N-Total: nitrógeno total (g/d); P: fósforo (g/d); K: potasio (g/d); E.E: error estándar; Sig: significancia; ns: no significativo (P > 0,05); *: significativo (P < 0,05).

Para una excreción media de $9,03 \pm 0,59$ kg MS de heces, las cantidades excretada de MO, PB, FND en heces no se vieron afectadas por el nivel de la proteína dietética. La excreción de EE fue significativamente mayor en el tratamiento de alta proteína que en el de baja proteína. Las excreciones del N-total y el N-NH₃ en heces no difirieron significativamente ($P > 0,05$) con la dieta con 230, 219 y 203 g N-Total/ día y 18,22; 13,77 y 15,95 g N-NH₃/ día de heces respectivamente para las dietas de alta, media y baja proteína.

Las vacas ingirieron de media $20,47 \pm 0,66$ kg MS/ día con 150 g/ día de P ingerido, y excretaron $48,98 \pm 2,35$ g/ día de P en heces, que implica que el 33% de lo comido se excreta en heces. Con relación al K, las vacas comieron 3,77g/ día de K y excretaron por heces el 21%, esto es 0,80 g/ día de K.

La tabla III.7 muestra la digestibilidad aparente (%) de MS, MO, PB, FND, EE, así como la materia orgánica digestible ingerida (MOD). La digestibilidad aparente de MS, MO, FND, EE, no difirió significativamente entre las dietas ($P > 0,05$). Mientras que la digestibilidad de la PB (%) fue menor significativamente en el tratamiento de baja proteína ($P < 0,05$). La materia orgánica digestible no fue afectada por el nivel de proteína en la dieta.

Tabla III.7. Digestibilidad de los nutrientes consumidos por las vacas lecheras alimentadas con diferentes concentraciones de proteína bruta.

	AP	MP	BP	E.E	Sig
Digestibilidad¹ (%)					
MS	56,75	55,67	54,97	2,247	ns
MO	59,86	58,59	57,88	1,605	ns
PB	56,31 ^{ab}	59,28 ^a	55,71 ^b	1,334	*
FND	44,08	44,15	43,61	2,544	ns
EE	74,28	74,06	80,19	2,555	ns
MOD² (kg/d)	11,07	10,90	10,14	0,880	ns

AP: alta proteína; MP: media proteína; BP: baja proteína; MS: materia seca (%); MO: materia orgánica (%); PB: proteína bruta (%); EE: extracto etéreo (%); FND: fibra neutro detergente (%); MOD: materia orgánica digestible (kg/d); E.E: error estándar; Sig: significancia; ns: no significativo ($P > 0,05$); *: significativo ($P < 0,05$)

a,b,c: Las medias en la misma fila con diferentes superíndices difieren significativamente ($P < 0,05$).

¹: La digestibilidad aparente fue estimada según la ecuación: D_a (%) = (contenido ingerido - contenido en heces)/contenido ingerido*100.

²: MOD (kg/d) fue calculada como (MO ingerida * DMO)/100. La digestibilidad de la materia orgánica (DMO) fue estimada según Riveros y Argamentaría., (1987).

IV. Excreción de N, P, K en la orina

En la tabla III.8, se muestra la composición de la orina en %MS, y contenido en nitrógeno amoniacal (N-NH₃) total (N-Total), fósforo (P) y potasio (K). Las cantidades excretadas de N-NH₃, N-total, P y K por la orina según el nivel de la proteína en la dieta son presentadas en la tabla III.9.

La orina tiene casi 4% de MS de media. Al aumentar el nivel de proteína en la dieta, la excreción de N-NH₃ en orina aumenta significativamente ($P < 0,05$). El nivel de la proteína afectó la excreción del N-total en la orina significativamente, con menos N-total excretado en la orina cuando las vacas se alimentaron con la dieta de baja proteína ($P < 0,05$). No hubo diferencias en la excreción de P y K con una media de 0,24 g P / día y 0,96 g K / día respectivamente.

Tabla III.8. Composición química de la orina según el nivel de proteína en la dieta.

	AP	MP	BP
MS (%)	4,05	3,61	3,94
N-Total (g/100 ml)	0,57	0,61	0,47
N-NH₃ (mg/100 ml)	10,55	7,62	2,76
P (%)	0,02	0,02	0,01
K (%)	0,10	0,11	0,10

AP: alta proteína; MP: media proteína; BP: baja proteína; N-Total: nitrógeno total, N-NH₃: nitrógeno amoniacal. P: fósforo; K: potasio.

Tabla III.9. Excreción total de orina y cantidad diaria excretada por orina de N-Total, N-NH₃, P y K según la dieta.

	AP	MP	BP	E.E	Sig
Excreción de orina (L/d)	25,21	24,35	23,76	1,256	ns
N-Total (g/d)	143,70 ^a	148,53 ^a	111,67 ^b	9,565	*
N-NH₃ (g/d)	2,66 ^a	1,85 ^{ab}	0,66 ^b	0,601	*
P (g/d)	0,23	0,35	0,13	0,086	ns
K (g/d)	0,99	0,94	0,94	0,077	ns

AP: alta proteína; MP: media proteína; BP: baja proteína; N-Total: nitrógeno total, N-NH₃: nitrógeno amoniacal. P: fósforo (g/d); K: potasio (g/d). E.E: error estándar. Sig.: significancia; ns: no significativo (P > 0,05); *: significativo (P < 0,05).

a,b,c: Las medias en la misma fila con diferentes superíndices difieren significativamente (P < 0,05).

V. Eficiencia del nitrógeno EN

En la tabla III.10 se presenta el nitrógeno ingerido (N_i) por día, el nitrógeno excretado en la leche (N_l) y la eficiencia de utilización del nitrógeno (EN).

Tabla III.10. Eficiencia del nitrógeno según el nivel de proteína en la dieta.

	AP	MP	BP	E.E	Sig
N_i (g/d)	525,19	538,18	458,31	28,536	ns
N_l (g/d)	157,06	150,61	142,76	12,459	ns
Eficiencia del N (%)	29,92	27,94	31,10	1,998	ns

AP: alta proteína (17%); MP: media proteína (15%); BP: baja proteína (13%); E.E: error estándar. Sig: significancia; ns: no significativo (P > 0,05); N_i: nitrógeno ingerido, N_l: nitrógeno en la leche.

La eficiencia de nitrógeno = (N_l / N_i) *100.

La EN fue 26,92 %, 27,94 % y 31,10 % respectivamente en los tratamientos de alta (AP), media (MP) y baja (BP) proteína. La EN fue casi de dos puntos más alta en el tratamiento BP que en el AP, aunque no alcanzó a mostrar diferencias significativas.

Discusión

Parte 4: Discusión

I. Ingestión voluntaria

Las ingestas de MS, MO, PB, FND y FAD, fueron similares entre los tratamientos, posiblemente porque las dietas fueron calculadas para ser isoenergéticas y equilibradas para satisfacer los requisitos de energía metabolizables de las vacas Holstein. Sin embargo, la ingestión de ALM y EE fueron significativamente más altas en el tratamiento de alta proteína que en los otros. Eso es debido a que la ración de AP contiene una mayor proporción de almidón y extracto etéreo (18,72% de ALM y 2,86 % de EE) que las otras raciones (14,41% y 15,64% de almidón y 2,46% y 2,36% de EE en los tratamientos de media y baja proteína respectivamente, tabla III.1).

En general, es bien sabido que el consumo de alimento aumenta a medida que aumenta el nivel de PB en la dieta (Argüello et al., 2003; Broderick y Reynal, 2009). El resultado del presente estudio es contrario al de Broderick (2003), quien informó que la ingesta de MS fue menor cuando la ración fue de 15,1% de PB que cuando fue de 16,7% y 18,4% de PB. También Edouard et al., (2016), demostraron que los animales que fueron alimentados con una dieta de 12% de PB ingirieron 0,8 kg de MS / día menos que los alimentados con 18% de PB.

La digestibilidad aparente de la proteína fue significativamente más alta en el tratamiento MP comparado con el tratamiento de BP. La dieta de MP contuvo más RDP (94,34 % MS) que la de BP (85,65% MS) (tabla III.1). Entonces, este efecto puede ser probablemente debido a una alta fermentación microbiana de la proteína, dado que el nitrógeno fecal se mantuvo constante entre los tratamientos (tabla III.6). En el mismo sentido, Hristov et al., (2004) y Wachirapakorn et al., (2013), informaron que la digestibilidad ruminal aparente y verdadera de MS, MO y FND no se vieron afectadas por los tratamientos de 15,8% o 18,3% de PB en las dietas. Con respecto a la digestibilidad aparente del N, Bahrami-Yekdangi et al., (2014), evaluó la adición de 156 a 180 g PB/kg MS en las dietas de ganado lechero, e informó que la digestibilidad aparente de proteínas aumenta con el nivel de PB en el tratamiento. Edouard et al., (2016), compararon una dieta de 18% PB con otra de 12% PB, donde los animales que fueron alimentados con bajas cantidades de N degradables tuvieron una reducción del 2,5% en la digestibilidad de la MS ($P < 0,001$).

II. Producción de leche y su composición química

En el presente estudio, los diferentes niveles de proteína de la dieta no afectaron ni la producción ni la composición de la leche. Estos resultados coinciden con estudios previos realizados por Bahrami-Yekdangi et al., (2014) y Guimarães et al., (2018), que informaron que dietas con diferentes niveles de proteína (17,2, 16,4 y 15,6 % de PB) no limitaron el rendimiento de la leche, la grasa de la leche o la proteína de la leche.

Sin embargo, en otros estudios, la producción de leche (Cyriac et al., 2008) y la concentración de proteína en la leche (Imaizumi et al., 2010, Lee et al., 2012) disminuyeron cuando se redujo la PB en la dieta.

III. Excreción de N, P, K en heces y orina

Los resultados del presente estudio confirman los resultados de Edouard et al., (2016) y Bahrami-Yekdangi et al., (2014), quienes encontraron una excreción de nitrógeno fecal similar con niveles variables de PB. El nitrógeno excretado en las heces se deriva de proteínas microbianas no digeribles producidas en el rumen, proteínas endógenas y proteínas dietéticas no digeribles. El nitrógeno fecal excretado varía con la ingestión de MS, que ella también varía con el tamaño y el peso vivo del animal y su nivel de producción (Nennich et al., 2005).

Con respecto al N-total y el N-NH₃ en la orina, Edouard et al., (2016) mostraron que cuando aumento el nivel de la proteína en la dieta de 12% PB a 18% de PB se aumentó sus excreciones en la orina de 65 g N-total/d a 243 g N-total/d y de 1,03 a 1,25 g NH₃/ h / vaca. También, Bahrami-Yekdangi et al., (2014), señalan que cuando sube la concentración de la proteína en la dieta de 15,5% PB a 18%PB, el N-total excretado en la orina aumentó también de 281,3 a 339,2 g N-total/d. El nitrógeno excretado en la orina resulta del catabolismo de la proteína en el organismo y de su excedente en la ración. Su excreción tiene por origen, un exceso de nitrógeno degradable en el rumen que no es valorizado por los microbios, o un exceso de aminoácidos a nivel intestinal no valorizado por el animal (Calsamiglia et al, 2010).

El fósforo se excreta principalmente en las heces (90 a 95%). La saliva participa en la homeostasis del fósforo porque su concentración salival está determinada por la de la

sangre, hasta la saturación de 2,5 a 3 mmol/l en la sangre. La excreción urinaria se produce, entre otras cosas, cuando la ingestión de P es excesiva o cuando la ración contiene una alta proporción de alimentos concentrados (Meshy, 2010, Geisert et al., 2010). Sin embargo, la excreción de potasio es principalmente urinaria y secundariamente fecal (Meschy, 2010) dependiendo directamente de la ingestión (Nennich et al., 2006).

IV. Eficiencia del nitrógeno EN

La EN fue más de dos puntos mayor en el tratamiento de baja proteína que el de alta proteína, porque la ingestión de N fue también más baja en el tratamiento de baja proteína aunque no alcanzo a mostrar diferencia significativa.

En el estudio de Edouard et al., (2016), observaron una diferencia estadística en la EN entre niveles de proteína. Así, cuando las vacas ingirieron una dieta del 12% PB tuvieron una EN del 31% que disminuyó al 22% cuando comieron una dieta de 18% de PB. También Guimarães et al., (2018) encontraron que la EN fue de 29,8 y 22,4% cuando PB dietética paso de 127 a 156 g/ kg MS, respectivamente y manteniendo el rendimiento de leche de las vacas.

Conclusión

Conclusión

A partir de los resultados obtenidos en el presente trabajo en el que se evalúa el efecto de tres niveles de proteína bruta en la dieta de vacas lecheras sobre la reducción de la excreción de nitrógeno y la emisión del amoníaco (NH_3) en el purín, sin que la cantidad ni la calidad de la leche se vean afectadas, se puede concluir que:

- ✓ El ganado lechero en el primer tercio de lactación puede tolerar durante al menos dos semanas, a una reducción de proteína en la ración al 14% de PB sin que la ingestión de materia seca, incluido el consumo del nitrógeno ni la producción de leche y su contenido de grasa y proteína se vean afectadas.
- ✓ La dieta de baja proteína (14%) podría haber promovido la reutilización de la urea para la síntesis microbiana, compensando la deficiencia de la proteína degradable para la producción de proteína de leche. Mientras que la dieta media proteína (15%) y de alta proteína (17%) con la misma cantidad de nitrógeno ingerida implicaron una uremia más alta, lo que resultó de la producción de NH_3 en el rumen por parte de los microbios. Este nitrógeno adicional se perdió como urea en la orina, lo que resultó en un aumento de NH_3 en la orina.

La reducción de la concentración de nitrógeno en la dieta ha tenido como resultado una eficiencia de utilización del nitrógeno similar entre tratamientos. Además, los impactos ambientales negativos podrían reducirse bajando las emisiones de amoníaco (acidificación, eutrofización, salud humana, etc.). Con respecto a la calidad del purín, se ha podido mantener la concentración en N, P, K del purín con menos emisiones de NH_3 cuando se reduce el nivel de proteína en la dieta.

Esta estrategia tendrá que ser validada por períodos más largos de estudio y para otros sistemas de manejo. El manejo de la calidad del purín como fertilizante orgánico se debe considerar la totalidad de la cadena de generación, almacenamiento y distribución de los mismos en los pastos/forrajes/cultivos con el fin de identificar e introducir medidas para

optimizar el reciclado de nutrientes en las explotaciones que mejore la producción y disminuya los costes de los fertilizantes químicos y mitigar la emisión de gases a efecto invernadero.

Referencias bibliográficas

Referencias bibliográficas

- Agabriel, J., 2010. Alimentation des bovins, ovins et caprins. Versailles: Editions Quae (Guide pratique), 312 p.
- Aguerre, M.J.; Wattiaux, M.A.; Hunt, T.; Larget, B.R., 2010. Effect of dietary crude protein on ammonia-N emission measured by herd nitrogen mass balance in a freestall dairy barn managed under farm-like conditions. *Animal*, 4 (8): 1390-1400.
- Aguerre, M.J.; Wattiaux, M.A.; Powell, J.M.; Broderick, G.A.; Arndt, C., 2011. Effect of forage to concentrate ratio in dairy cow diets on emission of methane, carbon dioxide, and ammonia, lactation performance, and manure excretion. *Journal of Dairy Science*, 94 (6): 3081-3093.
- Amon, B.; Amon, T.; Boxberger, J.; Alt, C., 2001. Emissions of NH₃, N₂O and CH₄ from dairy cows housed in a farmyard manure tying stall (housing, manure storage, manure spreading). *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 60 (1-3): 103-113.
- AOAC., 1984. Official Methods for Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 14th edition. Arlington, VA, 1141 pp.
- Argüello, A.; Castro, N.; Capote, J., 2003. Growth of milk replacer kids fed under three different managements. *Journal of Applied Animal Research*, 25: 37-40.
- Arriaga, H.; Salcedo, G.; Calsamiglia, S.; Merino, P., 2010. Effect of diet manipulation in dairy cow N balance and nitrogen oxides emissions from grasslands in northern Spain. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 135 (1/2): 132-139.
- ASAE D384., 2005. Manure Production and Characteristics.
- Asman, W.A.H., 1998. Factors influencing local dry deposition of gases with special reference to ammonia. *Atmospheric Environment*, 32 (3): 415-421.
- Astigarraga, L.; Peyraud, J.L.; Le Bars, M., 1993. Effect of level of nitrogen fertilization and protein supplementation on herbage utilization by grazing dairy cows: II. Faecal and urine nitrogen excretion. *Ann. Zootech*, 43: 3-292.
- Baek, B.H.; Aneja, V.P.; Tong, Q., 2004. Chemical coupling between ammonia, acid gases, and fine particles. *Environmental Pollution*, 129 (1): 89-98.
- Bahrami-Yekdangi, H.; Khorvash, M.; Ghorbani, G.R.; Alikhani, M.; Jahanian, R.; Kamalian, E., 2014. Effects of decreasing metabolizable protein and rumen-undegradable protein on milk production and composition and blood metabolites of Holstein dairy cows in early lactation. *Journal of Dairy Science*, 97: 3707-3714.

Bargo, F.; Muller, L.D.; Delahoy, J.E.; Cassidy, T.W., 2002. Milk response to concentrate supplementation of high production dairy cows grazing at two pasture allowances. *Journal of Dairy Science*, 85: 1777-1792.

Béline, F.; Daumer, M.L.; Guiziou, F., 2003. Traitement biologique aérobie du lisier de porcs: performances des systèmes de séparation de phases et caractéristiques des co-produits. *Technology*, 100 (22): 5444-5453.

Bittman, S.; Kowalenko, C.G.; Forge, T.; Hunt, D.E.; Bounaix, F.; Patni, N., 2007. Agronomic effects of multi-year surface-banding of dairy slurry on grass. *Bioresource Technology*, 98: 3249-3258.

Bittman, S.; Mikkelsen, R., 2009. Ammonia emissions from agricultural operations: livestock. *Better Crops with Plant Food*, 93 (1): 28-31.

Bluteau, C.V.; Masse, D.I.; Leduc, R., 2009. Ammonia emission rates from dairy livestock buildings in Eastern Canada. *Biosystems Engineering*, 103 (4): 480-488.

Borsting, C.F.; Kristensen, T.; Misciattelli, L.; Hvelplund, T.; Weisbjerg, M.R., 2003. Reducing nitrogen surplus from dairy farms. Effects of feeding and management. *Livestock Production Science*, 83 (2-3): 165-178.

Broderick, G.A., 2003. Effects of varying dietary protein and energy levels on the production of lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 86: 1370-1381.

Broderick, G.A.; Reynal, S.M., 2009. Effect of source of rumen degraded protein on production and ruminal metabolism in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 92: 2822-2834.

Butterbach-Bahl, K.; Gundersen, P.; Ambus, P.; Augustin, J.; Beier, C.; Boeckx, P.; Dannenmann, M.; Sanchez Gimeno, B.; Ibrom, A.; Kiese, R.; Kitzler, B.; Rees, R.M.; Smith, K.A.; Stevens, C.; Vesala, T.; Zechmeister-Boltenstern, S., 2011. Nitrogen processes in terrestrial ecosystems. In: Sutton, M.A.; Howard, C.M.; Erismann, J.W.; Billen, G.; Bleeker, A.; Grennfelt, P.; van Grinsven, H.; Grizzetti, B. *The European Nitrogen Assessment. Sources, Effects and Policy Perspectives*. Cambridge: Cambridge University Press, 99-125.

Calsamiglia, S.; Ferret, A.; Reynolds, C.K.; Kristensen, N.B.; van Vuuren, A.M., 2010. Strategies for optimizing nitrogen use by ruminants. *Animal*, 4 (7): 1184-1196.

Castillo, R.; Kerbead, E.; Beever, D.E.; France, J., 2000. A review of efficiency of nitrogen utilization in lactating dairy cows and its relationship with environmental pollution. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 9: 1-32.

Citepa, 2011. Inventaire des émissions de polluants atmosphériques et de gaz à effet de serre en France. Paris: Citepa (Séries sectorielles et analyses étendues. Format Secten), 328 p.

Cleveland, C.C.; Townsend, A.R.; Schimel, D.S.; Fisher, H.; Howarth, R.W.; Hedin, L.O.; Perakis, S.S.; Latty, E.F.; von Fischer, J.C.; Elseroad, A.; Wasson, M.F., 1999. Global patterns of terrestrial biological nitrogen (N₂) fixation in natural ecosystems. *Global Biogeochemical Cycles*, 13: 623-645.

Cyriac, J.; Rius, A.G.; Mcgilliard, M.L.; Pearson, R.E.; Bequette, B.J.; Hanigan, M.D., 2008. Lactation performance of mid-lactation dairy cows fed ruminally degradable protein at concentrations lower than National Research Council recommendations. *Journal of Dairy Science*, 91: 4704-4713.

de la Roza-Delgado, B.; Martínez-Fernandez, A.; Argamentarúa-Gutiérrez, A., 2002. Determinación de materia seca en pastos y forrajes a partir de la temperatura de secado para análisis. *Pasto*, 32: 91-104.

Decau, M.L.; Simon, J.C.; Jacquet, A., 2004. Nitrate leaching under grassland as affected by mineral nitrogen fertilization and cattle urine. *Journal of Environmental Quality*, 33(2): 637-644.

Del Prado, A.; Chadwick, D.; Cardenas, L.; Misselbrook, T.; Scholefield, D.; Merino, P., 2010. Exploring systems responses to mitigation of GHG in UK dairy farms. *Agriculture Ecosystems and Environment*, 136: 318-332

Del Prado, A.; Mas, k.; Prado, G.; Gallejones, P., 2013. Modelling the interactions between C and N farm balances and GHS emissions from confinement dairy farms in northern Spain. *Science of The Total Environment*, 465: 156-165.

Delaby, L.; Peyraud, J.L.; Vérité, R., 1995. Effect of milk yield level and feeding systems on N excretion in dairy cows. *Rencontres Recherches Ruminants*, 349-353.

Delaquis A.M., Block, E., 1995. Dietary cation-anion difference, acid-base status, mineral metabolism, renal function, and milk production of lactating cows. *Journal Dairy Science*, 78: 2259-2284.

Dentener, F.; Stevenson, D.; Ellingsen, K.; van Noije, T.; Schultz, M.; Amann, M.; Atherthon, C.; Bell, N.; Bergmann, D.; Bey, I.; Butler, T.; Bouwman, L.; Cofala, J.; Collins, B.; Drevet, J.; Eickhout, B.; Eskes, H.; Fiore, A.; Gauss, M.; Hauglustaine, D.; Horowitz, L.; Isaksen, I.; Josse, B.; Lawrence, M.; Krol, M.; Lamarque, J.F.; Montanaro, V.; Müller, J.F; Peuch, V.H.; Pitari, G.; Pyle, J.; Rast, S.; Rodriguez, I.; Sanderson, M.; Savage, N.H.; Shindell, D.; Strahan, S.; Szopa, S.; Sudo, K.; Van Dingenen, R.; Wild, O.;

Zeng, G., 2006. The global atmospheric environment for the next generation. *Environmental Science and Technology*, 40: 3586-3594.

Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. InfoStat versión 2018. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>

Dourmad, J.Y.; Jondreville, C., 2007. Impact of nutrition on nitrogen, phosphorus, Cu and Zn in pig manure, and on emissions of ammonia and odours. *Livestock Science*, 112: 192-198.

Duxbury, J.M., 1994. The significance of agricultural sources of greenhouse gases. *Fertilizer Research*, 38: 151-163.

Edouard, N.; Hassouna, M.; Robin, P.; Faverdin, P., 2011. Effect of diet protein level on nitrogen excretion and greenhouse gases emissions in lactating dairy cows. *Advances in Animal Biosciences*. 8. International Symposium on the Nutrition of Herbivores, Abersystwyth, UK, 1 p.

Edouard, N.; Hassouna, M.; Robin, P.; Faverdin, P., 2016. Low degradable protein supply to increase nitrogen efficiency in lactating dairy cows and reduce environmental impacts at barn level. *Animal*, 10(2): 212-20.

EEA., 2009. Atmospheric emission inventory guidebook. Copenhagen, Denmark European Environmental Agency (EEA).

Eisler, M.C.; Lee, M.R.; Tarlton, J.F.; Martin, G.B.; Beddington, J.; Dungait, J.A.; Greathead, H.; Liu, J.; Mathew, S.; Miller, H.; Misselbrook, T.; Murray, P.; Vinod, V.K.; Van Saun R.; Winter, M., 2014. Agriculture: Steps to sustainable livestock. *Nature*, 507: 32-34.

Erismann, J.W.; Sutton, M.A.; Galloway, J.N.; Klimont, Z.; Winiwarter, W., 2008. How a century of ammonia synthesis changed the world. *Nature Geoscience*, 1: 636-639.

Erismann, J.W.; van Grinsven, H.; Grizzetti, B.; Bouraoui, F.; Powlson, D.; Sutton, M.A.; Bleeker, A.; Reis, S., 2011. The European nitrogen problem in a global perspective. In: Sutton, M.A.; Howard, C.M.; Erismann, J.W.; Billen, G.; Bleeker, A.; Grennfelt, P.; van Grinsven, H.; Grizzetti, B., eds. *The European Nitrogen Assessment. Sources, Effects and Policy Perspectives*. Cambridge: Cambridge University Press, 9-31.

Fadul-Pacheco, L.; Pellerin, D.; Chouinard, P.Y.; Wattiaux, M.A.; Duplessis, M.; Charbonneau, É., 2017. Nitrogen efficiency of eastern Canadian dairy herds: effect on production performance and farm profitability. *Journal of Dairy Science*, 100: 6592-6601.

Faverdin, P.; Vérité, R., 2003. A dynamic model of nitrogen fluxes and uraemia in dairy cows. *Rencontres Recherches Ruminants*. Institut National de la Recherche Agronomique, 159-162.

Faverdin, P.; Delaby, L.; Vérité, R.; Marquis, B., 1998. Effet de la teneur en protéines et en aliments concentrés d'une ration complète à base d'ensilage de maïs sur l'ingestion et la production laitière de vaches laitières en début de lactation. *Rencontre. Recherche. Ruminants*, 5: 263.

Flechard, C.R.; Ambus, P.; Skiba, U.; Rees, R.M.; Hensen, A.; van Amstel, A.; Pol-van Dasselaar, A.V.; Soussana, J.F.; Jones, M.; Clifton-Brown, J.; Raschi, A.; Horvath, L.; Neftel, A.; Jocher, M.; Ammann, C.; Leifeld, J.; Fuhrer, J.; Calanca, P.; Thalman, E.; Pilegaard, K.; di Marco, C.; Campbell, C.; Nemitz, E.; Hargreaves, K.J.; Levy, P.E.; Ball, B.C.; Jones, S.K.; van de Bulk, W.C.M.; Groot, T.; Blom, M.; Domingues, R.; Kasper, G.; Allard, V.; Ceschia, E.; Cellier, P.; Laville, P.; Henault, C.; Bizouard, F.; Abdalla, M.; Williams, M.; Baronti, S.; Berretti, F.; Grosz, B., 2007. Effects of climate and management intensity on nitrous oxide emissions in grassland systems across Europe. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 121 (1-2): 135-152.

Forster, P.; Ramaswamy, V.; Artaxo, P.; Berntsen, T.; Betts, R.; Fahey, D.W.; Haywood, J.; Lean, J.; Lowe, D.C.; Myhre, G.; Nganga, J.; Prinn, R.; Raga, G.; Schulz, M.; van Dorland, R., 2007. Changes in atmospheric constituents and in radiative forcing. In: Solomon, S.; Qin, D.; Manning, M.; Chen, Z.; Marquis, M.; Averyt, K.B.; Tignor, M.; Miller, H.L., eds. *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 (GBR): Cambridge University Press.

FPPQ (Fédération des producteurs de porcs du Québec), 2005. Plan des interventions agroenvironnementales. Rampes d'épandage, 6 p.

FPPQ (Fédération des producteurs de porcs du Québec), 2007. « Plan des interventions agroenvironnementales: les couvertures sur les fosses à lisier », Fiche technique no 4: 6.

Gac, A.; Béline, F.; Bioteau, T.; Maguet, K., 2007. A French inventory of gaseous emissions (CH₄, N₂O, NH₃) from livestock manure management using a mass-flow approach. *Livestock Science*, 112 (3): 252-260.

Gasser, M.O.; carrier, R., 2008. Les rampes d'épandage pour lisiers pailleux. Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation (MAPAQ) et Institut de recherche et de développement en agroenvironnement (IRDA), 8.

Geisert, B.G.; Erickson, G.E.; Klopfenstein, T.J.; Macken, C.N.; Luebke, M.K.; Macdonald, J.C., 2010. Phosphorus requirement and excretion of finishing beef cattle fed different concentrations of phosphorus. *Journal Animal Science*, 88: 2393-2402.

Gietzen W.D., 1993. Neural mechanisms in the responses to amino acid deficiency. *Journal Animal Science*, 123: 610-625.

Guimarães, C.R.; Azevedo, R.A.; de Campos, M.M.; Machado, F.S.; Pedrosa, A.M.; Carnevalheira, L.; de R Coelho, S.G., 2018. Reduction of crude protein in diets fed to lactating Holstein-Gyr cows. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 53(7): 858-865.

Hertel, O.; Reis, S.; Skjoth, C.A.; Bleeker, A.; Harrison, R.; Cape, J.N.; Fowler, D.; Skiba, U.; Simpson, D.; Jickells, T.; Baker, A.; Kulmala, M.; Gyldenkaerne, S.; Sorensen, L.L.; Erisman, J.W., 2011. Nitrogen processes in the atmosphere. In: Sutton, M.A.; Howard, C.M.; Erisman, J.W.; Billen, G.; Bleeker, A.; Grennfelt, P.; van Grinsven, H.; Grizzetti, B., eds. *The European Nitrogen Assessment. Sources, Effects and Policy Perspectives*. Cambridge: Cambridge University Press, 177-207.

Hristov, A.N.; Etter, R.P.; Ropp, J.K.; Grandeen, K.L., 2004. Effect of dietary crude protein level and degradability on ruminal fermentation and nitrogen utilization in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 82: 3219-3229.

Hutchinson, G.L.; Davidson, E.A., 1993. Processes for production and consumption of gaseous nitrogen oxides in soil. In: Harper, L.A.; Mosier, A.R.; Duxbury, J.M.; Rolston, D.E., eds. *Agricultural Ecosystem Effects on Trace Gases and Global Climate Change*. American Society of Agronomy, Madison, 79-93.

IFA., 2009. *Assessment of the Impact of Biofuel Production on World Fertilizer Demand*.

Ifen., 2002. *L'environnement en France*. Paris, France: Editions La Découverte, 607 p.

ILFA (Institut laitier et fourrager de l'Atlantique), 2008. Certification du protocole et de la calculatrice à l'effet des gaz à effet de serre pour laitière canadienne. Document de travail scientifique préparé par. Rob Janzen Agriculture et Agroalimentaire Canada, 42 p.

Imazum, H.; Santos, F.A.P.; Bittar, C.M.M.; Correia, P.S.; Martinez, J.C., 2010. Diet crude protein content and sources for lactating dairy cattle. *Scientia Agricola*, 67: 16-22.

INRA., 2007. *Alimentation des bovins, ovins et caprins. Besoins des animaux – Valeur des aliments*. Tables Inra 2007, mise à jour 2010. Editions Quæ, 2010, 311 p.

Jarvis, S.; Hutchings, N.; Brentrup, F.; Olesen, J.E.; van de Hoek, K.W., 2011. Nitrogen flows in farming systems across Europe. In: Sutton, M.A.; Howard, C.M.; Erisman, J.W.; Billen, G.; Bleeker, A.; Grennfelt, P.; van Grinsven, H.; Grizzetti, B., eds. *The European Nitrogen Assessment. Sources, Effects and Policy Perspectives*. Cambridge: Cambridge University Press, 211-228.

Johnson, J.M.F.; Franzluebbbers, A.J.; Wyers, S.L.; Reicosky, D.C., 2007. Agricultural opportunities to mitigate greenhouse gas emissions. *Environmental Pollution*, 150: 107-124.

Laville, P.; Flura, D.; Gabrielle, B.; Loubet, B.; Fanucci, O.; Rolland, M.N.; Cellier, P., 2009. Characterisation of soil emissions of nitric oxide at field and laboratory scale using high resolution method. *Atmospheric Environment*, 43 (16): 2648-2658.

Lantinga, E.A.; Keuning, J.A.; Groenwold, J.; Deenen, P.J., 1987. Distribution of excreted nitrogen by grazing cattle and its effects on sward quality, herbage production and utilization. In: Van Der Meer, H.G.; Unwin, R.J.; Van Dijk, T.A.; Ennik, G.C., eds. *Animal manure on grassland and fodder crops. Fertilizer or waste?* Leiden: Martinus Nijhoff Publishers, 103-117.

Lee, C.; Hristov, A.N.; Heyler, K.S.; Cassidy, T.W.; Lapierre, H.; Varga, G.A.; Parys, C., 2012. Effects of metabolizable protein supply and amino acids supplementation on nitrogen utilization, production and ammonia emissions from manure in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 95: 5253-5268.

Lehuger, S., 2009. Modélisation des bilans de gaz à effet de serre des agro-écosystèmes en Europe. Thèse. AgroParistech, Paris. 184 p.

Leip, A.; Achermann, B.; Billen, G.; Bleeker, A.; Bouwman, A.F.; de Vries, A.; Dragosits, U.; Doring, U.; Fernall, D.; Geupel, M.; Herolstab, J.; Johnes, P.; Le Gall, A.C.; Monni, S.; Neveceral, R.; Orlandini, L.; Prud'homme, M.; Reuter, H.I.; Simpson, D.; Seufert, G.; Spranger, T.; Sutton, M.A.; van Aardenne, J.; Vos, M.; Winiwarter, W., 2011. Integrating nitrogen fluxes at the European scale. In: Sutton, M.A.; Howard, C.M.; Erisman, J.W.; Billen, G.; Bleeker, A.; Grennfelt, P.; van Grinsven, H.; Grizzetti, B., eds. *The European Nitrogen Assessment. Sources, Effects and Policy Perspectives*. Cambridge: Cambridge University Press, 345-376.

Lesschen, J.P.; van den Berg, M.; Westhoek, H.J.; Witzke, H.P.; Velthof, G.L.; Oenema, O., 2011. Greenhouse gas emission profiles of European livestock sectors. *Animal Feed Science Technology*, 166-167.

Leterme, P.; Barre, C.; Vertès, F., 2003. The fate of N-15 from dairy cow urine under pasture receiving different rates of N fertiliser. *Agronomie*, 23 (7): 609-616.

Marini, J.C.; van Amburgh, M.E., 2005. Partition of nitrogen excretion in urine and the feces of Holstein replacement heifers. *Journal of Dairy Science*, 88 (5): 1778-1784.

Martin, D.Y.; Landry, C.; Léveillé, F., 2008. « Intérêt agronomique d'un séparateur décanteur-centrifuge pour la séparation des lisiers de porc », Institut de recherche et de développement en agroenvironnement (IRDA), 2 p., sur le site de AgriRéseau.

- Meschy, F., 2010, Nutrition minérale des ruminants, Quae, Versailles, 208.
- Mitran, L.; Harter-Dennis, J.M.; Meisinger, I.J., 2008. Determining the nitrogen budget and total ammoniacal nitrogen emissions from commercial broilers grown in environmental chambers. *Journal of Applied Poultry Research*, 17 (1): 34-46.
- Mulligan, F.J.; Dillon, P.; Callan, J.J.; Rath, M.; O'Mara, F.P., 2004. *Journal of Dairy Science*, 87: 3451-3460.
- Nadeau, E.; Englund, J.E.; Gustafsson, A.H., 2007. Nitrogen efficiency of dairy cows as affected by diet and milk yield. *Livestock Science*, 111 (1-2): 45-56.
- Neijat, M.; House, J.D.; Guenter, W.; Kebreab, E., 2011. Production performance and nitrogen flow of shaver white layers housed in enriched or conventional cage systems. *Poultry Science*, 90 (3): 543-554.
- Nennich, T.D.; Harrison, J. H.; Van Wieringen, L.M.; Meyer, D.; Heinrichs, A.J.; Weiss, W.P.; St Pierre, N.R.; Kincaid, R.L.; Davidson, D.L.; Block, E., 2005. Prediction of manure and nutrient excretion from dairy cattle. *Journal Dairy Science*, 88: 3721-3733.
- NRC., (2001). Nutrient requirements of dairy cattle. 7th revised edition. National research Council, National Academy Press, Washington, DC. pp.381.
- Oenema, O.; Witzke, H.P.; Klimont, Z.; Lesschen, J.P.; Velthof, G.L., 2009. Integrated assessment of promising measures to decrease nitrogen losses from agriculture in EU-27. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 133 (3/4): 280-288.
- Olivier, J.G.L.; Bouwman, A.F.; Van der Hoek, K.W.; Berdowski, J.J.M., 1998. Global air emission inventories for anthropogenic sources of NO_x, NH₃ and N₂O. Proceedings of the first international nitrogen conference. The Netherlands, 23-27 March. Elsevier Science, 135-148.
- PAGES (Programme d'atténuation des gaz à effet de serre), 2005. Équipements d'épandage et gestion des lisiers: caractérisation de 75 chantiers, saison 2004. Clubs-conseils en agroenvironnement. 8 p.
- Peyraud, J.L.; Vérité, R.; Delaby, L., 1995. Rejets azotés chez la vache laitière: effets du type d'alimentation et du niveau de production des animaux. *Fourrages*, 142: 131-144.
- Peyraud, J.L.; Astigarraga, L., 1998. Review of the effect of nitrogen fertilization on the chemical composition, intake, digestion and nutritive value of fresh herbage: consequences on animal nutrition and N balance. *Animal Feed Science and Technology*, 72 (3-4): 235-259.

Peyraud, J.L.; Cellier, P.; Aarts, F.; Béline, C.; Bockstaller, C.; Bourblanc, M.; Delaby, L.; Donnars, C.; Dourmad, J.Y.; Dupraz, P.; Durand, P.; Faverdin, P.; Fiorelli, J.L.; Gaigné, C.; Girard, A.; Guillaume, F.; Kuikman, P.; Langlais, A.; Le Goffe, P.; Le Perchec, S.; Lescoat, P.; Morvan, T.; Nicourt, C.; Parnaudeau, V.; Peyraud, J.L.; Réchauchère, O.; Rochette, P.; Vertes, F.; Veysset, P., 2012. Les flux d'azote liés aux élevages, réduire les pertes, rétablir les équilibres. Expertise scientifique collective, rapport, Inra (France), 527 pages.

Powell, J.M.; Jokela, W.E.; Misselbrook, T.H., 2011. Dairy slurry application method impacts ammonia emission and nitrate leaching in no-till corn silage. *Journal of Environmental Quality*, 40 (2): 383-392.

Reidy, B.; Dämmgen, U.; Döhler, H.; Eurich-Menden, B.; van Evert, F.K.; Hutchings, N.J.; Luesink, H.H.; Menzi, H.; Misselbrook, T.H.; Monteny, G.J.; Webb, J., 2008. Comparison of models for national agricultural ammonia emission inventories in Europe: liquide manure systems. *Atmospheric Environment*, 42: 3452-3464.

Rico-Gomez M.; Faverdin P., 2001. La nutrition protéique modifie l'ingestion des vaches laitières: analyse bibliographique. *Renc. Recherche Ruminants*, 8: 285-288.

Riveros, E.; Argamentería, A., 1987. Metodos enzimáticos de la prediccion de la digestibilidad in vivo de la materia orgánica de forrajes. I. Forrajes verdes. II. Henos. III. Ensilados y pajas. *Avances en producción Animal*, 12: 49-75.

Robinson, P.H.; Fredeen, A.H.; Chalupa, W.; Julien, W.E.; Sato, H.; Fujieda, T.; Suzuki, H., 1995. Ruminally protected lysine and methionine for lactating dairy cows fed designed to meet requirements for microbial and postruminal protein. *Journal Dairy Science*, 78: 582-594.

Rochette, P., 2008. « Gestion des engrais minéraux et organiques: volatilisation de l'ammoniac ». Colloque en agroenvironnement, Centre de référence en agriculture et agroalimentaire du Québec, sur le site de AgriRéseau.

Rulquin, H.; Delaby, L., 2001. Les niveaux de LysDI couramment rencontrés en France ne modifient pas la réponse à une augmentation des teneurs en MetDI de la ration des vaches laitières. *Rencontre. Recherche. Ruminants*, 8: 301.

Salcedo, G., 2006. Uso sostenible del nitrógeno en la alimentación de vacas lecheras.

Simon, J.C.; Grignani, C.; Jacquet, A.; Le Corre, L.; Pages, J., 2000. Typology of nitrogen balances on a farm scale: research of operating indicators. *Agronomie*, 20 (2): 175-195.

Sitch, S.; Cox, P. M.; Collins, W.J.; Huntingford, C., 2007. Indirect radiative forcing of climate change through ozone effects on the land-carbon sink. *Nature*, 448 (16): 791-795.

Smith, P.D.; Martino, Z.; Cai, D.; Gwary, H.; Janzen, P.; Kumar, B.; McCarl, S.; Ogle, F.; O'Mara, C.; Rice, B.; Scholes, O.; Sirotenko, O., 2007. Agriculture. In: Metz, B.; Davidson, O.R.; Bosch, P.R.; Dave, R.; Meyer, L.A., eds. *Climate change 2007: Mitigation. Contribution of Working Group III to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge: Cambridge University Press, 497-539.

Snow, V.O.; Johnson, I.R.; Parsons, A.J., 2009. The single heterogeneous paddock approach to modelling the effects of urine patches on production and leaching in grazed pastures. *Crop & Pasture Science*, 60 (7): 691-696.

Sommer, S.G.; Petersen, S.O.; Sorensen, P.; Poulsen, H.D.; Moller, H.B., 2007. Methane and carbon dioxide emissions and nitrogen turnover during liquid manure storage. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 78 (1): 27-36.

Sutton, M.A.; Billen, G.; Bleeker, A.; Erisman, J.W.; Grennfelt, P.; van Grinsven, H.; Grizzetti, B.; Howard, C.M.; Leip, A., 2011a. Technical summary. In: Sutton, M.A.; Howard, C.M.; Erisman, J.W.; Billen, G.; Bleeker, A.; Grennfelt, P.; van Grinsven, H.; Grizzetti, B., eds. *The European Nitrogen Assessment. Sources, Effects and Policy Perspectives*. Cambridge: Cambridge University Press, 35-51.

Sutton, M.A.; Howard, C.M.; Erisman, J.W.; Bealey, J.; Billen, G.; Bleeker, A.; Bouwman, L.; Grennfelt, P.; van Grinsven, H.; Grizzetti, B., 2011b. The challenge to integrate nitrogen science and policies: the European Nitrogen Assessment approach. In: Sutton, M.A.; Howard, C.M.; Erisman, J.W.; Billen, G.; Bleeker, A.; Grennfelt, P.; van Grinsven, H.; Grizzetti, B., eds. *The European Nitrogen Assessment. Sources, Effects and Policy Perspectives*. Cambridge: Cambridge University Press, 52-96.

Valk, H., 1994. Effects of partial replacement of herbage by maize silage on N-utilization and milk production of dairy cows. *Livestock Production Science*, 40: 241-252.

Van Doorslaer, B.V.; Witzke, P.; Huck, I.; Weiss, F.; Fellmann, T.; Salputra, G.; Jansson, T.; Drabik, D.; Leip, A., 2015. An economic assessment of GHG mitigation policy options for EU agriculture. Luxembourg: Publications Office of the European Union.

Van Duinkerken, G.; André, G.; Smits, M.C.J.; Monteny, G.J.; Šebek, L.B.J., 2005. Effect of rumen degradable protein balance and forage type on bulk milk urea concentration and emission of ammonia from dairy cow houses. *Journal of Dairy Science*, 88 (3): 1099-1112.

Van Duinkerken, G.; Smits, M.C.J.; Andre, G.; Sebek, L.B.J.; Dijkstra, J., 2011. Milk urea concentration as an indicator of ammonia emission from dairy cow barn under restricted grazing. *Journal of Dairy Science*, 94 (1): 321-335.

van Grinsven, H.J.M.; Ten en Berge, H.F.M.; Dalgaard, T.; Fraters, B.; Durand, P.; Hart, A.; Hofman, G.; Jacobsen, B.H.; Lalor, S.T.J.; Lesschen, J.P.; Osterburg, B.; Richards, K.G.;

Techen, A.K.; Vertès, F.; Webb, J.; Willems, W.J., 2012. Management, regulation and environmental impacts of nitrogen fertilization in Northwestern Europe under the Nitrates Directive; a benchmark study. *Biogeosciences*, 9: 5143-5160

Van Soest, P. J.; Robertson, J. B.; 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 Vuuren, A.M.; Meijs, J.A.C., 1987. Effects of herbage composition and supplement feeding on the excretion of nitrogen in dung and urine by grazing dairy cows. In: van der Meer, H.G.; Unwin, R.J.; van Dijk, T.A.; Ennik, G.C., eds. *Animal Manure on Grassland and Fodder Crops. Fertilizer or waste ?* Leiden: Martinus Nijhoff Publishers, 17-25.

Vanasse, A., 2004. Programme d'atténuation des gaz à effet de serre (PAGES). Leadership de l'agriculture dans la réduction des GES. 4 p nitrogen in dung and urine by grazing dairy cows. In: van der Meer, H.G.; Unwin, R.J.; van Dijk, T.A.; Ennik, G.C., eds. *Animal Manure on Grassland and Fodder Crops. Fertilizer or waste ?* Leiden: Martinus Nijhoff Publishers, 17-25.

Vérité R.; Delaby L., 1998. Conduite alimentaire et rejets azotés chez la vache laitière. Interrelations avec les performances. *Rencontre. Recherche. Ruminants*, 5: 185-192.

Vérité, R.; Delaby, L., 2000. Relation between nutrition, performances and nitrogen excretion in dairy cows. *Annales de Zootechnie*, 49 (3): 217-230.

Vertes, F.; Simon, J.C.; Giovanni, R.; Grignani, C.; Corson, M.; Durand, P.; Peyraud, J.L., 2008. Flux de nitrate dans les élevages bovins et qualité de l'eau: variabilité des phénomènes et diversité des conditions. *Comptes Rendus de l'Académie d'Agriculture de France*, 94 (3): 6-7.

Wachirapakorn, C.; Parmaluk, P.; Wanapat, M.; Pakdee, P.; Cherdthong, A., 2013. Effects of levels of crude protein and ground corn cobs in total mixed ration on intake, rumen fermentation and milk production in crossbred Holstein Friesian lactating dairy cows. *Journal of Applied Animal Research*, 42(3): 263-268.

Wanapat, M.; Pilajun, R.; Kongmun, P., 2009. Ruminant ecology of swamp buffalo as influenced by dietary sources. *Animal Feed Science Technology*, 151:205-214.

Wilkerson, V.A.; Mertens, D.R.; Casper, D.P., 1997. Prediction of excretion of manure and nitrogen by Holstein dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 80 (12): 3193-3204.

Wolfe, A.H.; Patz, J.A., 2002. Reactive nitrogen and human health: acute and long-term implications. *Ambio*, 31 (2): 120-125.

Wurtman, J.R., 1986. Ways that foods can affect the brain. *Nutrition. Reviews.*, 44: 2-6.

Yan, T.; Frost, J.P.; Keady, T.W.J.; Agnew, R.E.; Mayne, C.S., 2007. Prediction of nitrogen excretion in feces and urine of beef cattle offered diets containing grass silage. *Journal of Animal Science*, 85 (8): 1982-1989.

Yan, T.; Frost, J.P.; Agnew, R.E.; Binnie, R.C.; Mayne, C.S., 2006. Relationships among manure nitrogen output and dietary and animal factors in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 89 (10): 3981-3991.