

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL
CUSCO**

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

ESCUELA PROFESIONAL DE ZOOTECNIA



**“EVALUAR LA CANTIDAD DE METANO PRODUCIDO EN VACUNOS
BAJO CONDICIONES DE PASTOREO CON SUPLEMENTACIÓN
NUTRICIONAL (ENSILADO Y TANINOS) A 4300 M.S.N.M. EN ÉPOCA
DE SECAS”**

**Tesis presentada por la Bachiller en Ciencias Agrarias:
LIZ BEATRIZ CHINO VELASQUEZ, para optar al
título profesional de INGENIERO ZOOTECNISTA.**

ASESOR:

Ing. M.Sc. JUAN E. MOSCOSO MUÑOZ

CUSCO

2016

DEDICATORIA

A Dios y la Virgen que me amparan y cuidan siempre.

A San Jerónimo por su resguardo.

.A mis queridos padres Rosa y Roberto, que siempre me apoyaron con las decisiones que tomé y me brindan su amor incondicional.

A mi pequeño hermano Axel, quién me saca una sonrisa en los peores momentos.

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi agradecimiento especial a mi asesor M.Sc. Juan Moscoso Muñoz, por su apoyo incondicional y confianza en todo momento.

A mis dictaminantes, Ing. Jim Cardenas y Mgt. Darwin Urquizo, por su orientación y consejos en la mejora del presente trabajo.

A todos los docentes de la Escuela Profesional de Zootecnia, de manera especial al Ing. Dunker Álvarez, Andrés Estrada, Ángel Altamirano, Cesar Ordoñez, Benjamín Zapata, Roberto Loaiza por sus consejos, paciencia y orientaciones y me dieron los conocimientos y enseñanzas durante mi formación profesional y personal.

A mis asesores externos, Ing. Francisco Franco y al Dr. Cesar Pinares por brindarme sus conocimientos en el tema y la investigación.

A todos mis amigos y aquellos que me han apoyado durante mi formación profesional, de manera muy especial a Vianca por su amistad y compañía en todo momento.

A mi familia que depositó su confianza en mí, con cariño especial a mi tía-madrina Verónica y mis abuelitos Paulina y Juan por sus sabios consejos.

De manera muy especial a ti por tu amor y comprensión.

INDICE DE CONTENIDO

DEDICATORIA.....	i
AGRADECIMIENTOS	ii
INDICE DE CONTENIDO.....	iii
INDICE DE CUADROS	v
INDICE DE FIGURAS	vi
INDICE DE ANEXOS	vii
GLOSARIO.....	viii
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
1. CAPITULO I.....	6
PROBLEMA OBJETO DE ESTUDIO	6
1.1. OBJETIVO Y JUSTIFICACIÓN.....	7
1.2. HIPÓTESIS.....	7
1.3. JUSTIFICACIÓN.....	7
2. CAPITULO III.....	9
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	9
2.1. SISTEMA DE ALIMENTACIÓN DE VACUNOS ALTO ANDINOS	9
2.2. EFECTOS DE LOS GASES DE EFECTO INVERNADERO SOBRE LOS SISTEMAS DE PRODUCCIÓN	13
2.3. ESTRATEGIAS DE MITIGACIÓN DE LAS EMISIONES DE METANO.....	28
2.4. TÉCNICAS DE MEDICIÓN DE METANO.....	37
3. CAPITULO IV	52
MATERIALES Y MÉTODOS	52
3.1. ÁREA DE ESTUDIO	52
3.2. DURACIÓN DEL TRABAJO	53
3.3. MATERIALES Y EQUIPOS.....	53
3.4. METODOLOGÍA	55
3.5. DISEÑO ESTADÍSTICO PARA EVALUACIÓN DE LOS RESULTADOS	71

4. CAPÍTULO V	72
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	72
4.1. CANTIDAD DE METANO PRODUCIDO (CH ₄ , g/día).....	72
4.2. CANTIDAD DE METANO PRODUCIDO (CH ₄ , l/día)	74
4.3. CANTIDAD DE METANO PRODUCIDO (CH ₄ , g/kg PV/día).....	75
4.4. CANTIDAD DE METANO PRODUCIDO (CH ₄ , g/kg PV ^{0.75}).....	76
4.5. CANTIDAD DE METANO PRODUCIDO (CH ₄ , g/kg MS).....	77
4.6. ANÁLISIS NUTRICIONAL DE LOS ALIMENTOS CONSUMIDOS	78
5. CAPÍTULO VI	81
CONCLUSIONES.....	81
RECOMENDACIONES	82
6. CAPITULO VI	83
BIBLIOGRAFÍA	83

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Resumen de las modificaciones del recipiente de colección usando la técnica del SF ₆	43
Cuadro 2. Características de las vacas utilizadas	53
Cuadro 3. Características generales de los tubos de permeación	56
Cuadro 4. Características de los tubos de permeación seleccionados	57
Cuadro 5. Registro de aplicación de tubos a las vacas	64
Cuadro 6. Disponibilidad forrajera sector Huaracóni	67
Cuadro 7. Metano producido por tratamiento (CH ₄ , g/día)	72
Cuadro 8. Metano producido por tratamiento (CH ₄ , l/día)	75
Cuadro 9. Metano producido por tratamiento (CH ₄ , g/kg PV/día).....	76
Cuadro 10. Metano producido por tratamiento (CH ₄ , g/kg PV ^{0.75}).....	77
Cuadro 11. Metano producido por tratamiento (CH ₄ , g/kg MS)	77
Cuadro 12. Análisis nutricional de los alimentos consumido por las vacas	80

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fermentación ruminal para la formación de metano	24
Figura 2. Metabolismo de los carbohidratos en el rumen	27
Figura 3. Formas de los recipientes de colección (tanques)	42
Figura 4. Modelos de aparatos de muestreo	43
Figura 5. Diferentes posiciones de los recipientes de colección	44
Figura 6. Formas de capilares usados para la restricción de flujo.....	46
Figura 7. Pesaje de tubos de permeación	57
Figura 8. Prueba de tanque en forma de “V” de PVC.....	59
Figura 9. Construcción de tanques en forma de tubo.....	60
Figura 10. Evaluación de líneas capilares.....	62
Figura 11. Adaptación de las vacas al aparato de muestreo.....	63

INDICE DE ANEXOS

Anexo I. Calibración de tubos de permeación en gramos (g).....	95
Anexo II. Evaluación de tanques.....	96
Anexo III. Evaluación de capilares.....	96
Anexo IV. Registro de vacas en adiestramiento.....	97
Anexo V. Cromatograma de CH ₄	98
Anexo VI. Cromatograma de SF ₆	99
Anexo VII. Modelo de cálculo de metano.....	100
Anexo VIII. Análisis de varianza y prueba de Duncan de la producción de metano en gramos por día (CH ₄ , g/día).....	101
Anexo IX. Análisis de varianza y prueba de Duncan de la producción de metano en litros por día (CH ₄ , l/día).....	101
Anexo X. Análisis de varianza y prueba de Duncan de la producción de metano en gramos por kilogramo de peso vivo (CH ₄ , g/kg PV/día).....	102
Anexo XI. Análisis de varianza y prueba de Duncan de la producción de metano entre días.....	102
Anexo XII. Análisis de varianza y prueba de Duncan de la producción de metano producido en gramos por kilogramo de peso metabólico (CH ₄ , g/kg P ^{0.75})..	104
Anexo XIII. Análisis de varianza y prueba de Duncan de la producción de metano producido en gramos por kilogramo de materia seca consumida (CH ₄ , g/kg MS).....	104

GLOSARIO

SF₆	Hexafloruro de azufre
CH₄	Metano
CO₂	Dioxido de carbono
IPCC	Panel Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático
GEI	Gases de efecto invernadero
N₂O	Óxido nitroso
MS	Materia seca
FDN	Fibra Detergente Neutro
FDA	Fibra Detergente Ácido
EN	Energía Neta
EM	Energía Metabolizable
EB	Energía Bruta
AGV	Ácidos Grasos Volátiles
PC	Proteína Cruda
MO	Materia Orgánica
CV	Coeficiente de variabilidad
D.E	Desviación estándar

RESUMEN

Se realizó el estudio “Evaluar la cantidad de metano producido en vacunos bajo condiciones de pastoreo con suplementación nutricional (ensilado y taninos) a 4 300 m.s.n.m. en época de secas”; en el Centro Experimental “La Raya”, ubicada en el distrito de Marangani, provincia de Canchis y departamento de Cusco; entre diciembre del 2014 a marzo del 2016. Se utilizó 5 vacas de 8 años y medio en promedio, las vacas fueron evaluadas en dos tratamientos que correspondieron a la medición de metano de acuerdo a su dieta (pastura natural y ensilado) y a la medición de metano utilizando un aditivo nutricional (taninos), bajo un Diseño Completamente al Azar (DCA). La cantidad de metano producido para el tratamiento con ensilado fue de 578,71 g/día y para el tratamiento con adición de taninos fue de 415,91 g/día, encontrándose diferencias estadísticas significativas entre tratamientos ($p < 0,05$) ; al calcular la emisión de metano producido en l/día el tratamiento con ensilado fue de 882,54 l/día y con taninos fue de 634,26 l/día encontrándose diferencias estadísticas significativas entre tratamientos ($p < 0,05$), según la medición de metano en este estudio se muestra una reducción del metano de aproximadamente un 28% con la adición de taninos a su dieta, demostrando su efecto mitigador, en cuanto a la expresión por kilogramo de peso vivo también fue influenciada con el tratamiento de taninos, siendo este menor con 0,87 g/kg PV/día comparado al de ensilado con 1,53 g/kg PV/día, encontrándose diferencias estadísticas significativas entre tratamientos ($p < 0,05$) por otro lado la cantidad de metano producido por peso metabólico no se vio afectada en ninguno de los tratamientos por lo que no se encontró diferencias significativas ($p > 0,05$) siendo la media para el tratamiento con ensilado 5,72 g/kg PV^{0.75} y con la adición de taninos 4,06 g/kg PV^{0.75} ; por último se

calculó la cantidad de metano producido en gramos por cada kilogramo de materia seca consumida no encontrándose diferencias significativas entre tratamientos ($p>0,05$) siendo la media para el tratamiento con ensilado 41,08 g/kg MS y para el tratamiento con taninos 29,01 g/kg MS.

Palabras clave: metano, ensilado, taninos, efecto mitigador, vacas.

INTRODUCCIÓN

El cambio climático es uno de los problemas más importantes a nivel mundial en los últimos años; por lo que fue declarado en la Cumbre de Tierra de Rio de Janeiro (1992) como uno de los tres grandes problemas de la naturaleza junto a la pérdida de biodiversidad y al adelgazamiento de la capa de ozono estratosférico; el calentamiento global está asociado al incremento de gases de efecto invernadero (GEI) hacia la atmósfera siendo los principales GEIs que se emiten a causa de las actividades antropogénicas el dióxido de carbono (CO₂), metano (CH₄) y óxido nitroso (N₂O)(ONU, 1992).

El aumento de la concentración de los GEIs en la atmósfera está incrementando la temperatura en la Tierra y las estimaciones realizadas para algunos escenarios de emisiones futuras, que antes de fin de siglo el aumento será del orden de 2 a 6 ° C (Foster *et al*, 2007; IPCC, 2007). Las observaciones directas de cambio recientes, a escala global y regional son el aumento de las temperaturas medias en el aire y en los océanos, el derretimiento de nieve y hielos, y el aumento del nivel medio del mar.

En este contexto la producción animal es una fuente importante de emisión de GEI en todo el mundo, según numerosas publicaciones la contribución de las actividades agro ganaderas es el 8-12% de la producción total de GEI, de éstas aproximadamente un 5,1% son atribuidos a la ganadería y sus deyecciones (FAO, 2010; Gill *et al* 2010) El metano (CH₄) es un potente GEI, que tiene 25 veces más potencial invernadero que el CO₂. (IPCC, 2007).

Las emisiones globales de metano de los rumiantes están dominados por el ganado vacuno (~70%) con el resto proveniente del búfalo, oveja, cabra, camellos, caballos, etc. asignando los factores de emisiones de CH₄ de 35 kg/año para ganado que reside en países desarrollados y 55 kg/año en naciones en desarrollo (Crutzen *et al*, 1988).

La ganadería en el Perú se caracteriza por sistemas al pastoreo y se desarrolla en las zonas alto andinas; en éste contexto el vacuno constituye una de las mayores fuentes de emisiones de CH₄; en base a las estimaciones efectuadas por Gómez (2009) para el Perú se asume que es el 64% al total de las emisiones; este hecho puede ser explicado por la pobre calidad nutricional del forraje (pasturas nativas alto andinas) generalmente, cuando el ganado es alimentado por dietas para promover el crecimiento rápido con alta calidad alimenticia, la proporción de energía alimenticia perdida como metano es reducida (Czeskawski *et al*, 1988), lo cual no sucede en el país especialmente bajo las condiciones mencionadas anteriormente.

Las estimaciones de CH₄ se ha hecho a nivel del TIER I el cual indica que la real medición de CH₄ podría ser mayor es por ello que para desarrollar estrategias de mitigación es necesario conocer las mediciones reales acordes a las condiciones de producción sobre todo en las zonas altas del país, una de las tecnologías usadas para la medición es el método del hexafluoruro de azufre (SF₆) como trazador de la producción entérica de CH₄, lo cual permite la evaluación de la estimación de las emisiones de animales individuales en pastoreo (Lassey *et al*, 1997; Johnson *et al*, 1994)

Existe diversas investigaciones acerca de las formas de mitigación para los GEI, de manera muy específica para la reducción de la producción de metano entérico, estas estrategias se basan en el manejo de la calidad del forraje y con aditivos alimenticios entre los cuales se encuentran la utilización de ionóforos, saponinas, aceites esenciales, inhibidores y taninos; se ha demostrado que se puede reducir hasta en un 30% la producción de metano con la utilización de taninos a través de su poder para ligarse a los compuestos de las células (proteínas, carbohidratos), su capacidad inhibitoria de algunas bacterias metanogénicas y disminuir la degradabilidad de materia seca.

CAPITULO I

PROBLEMA OBJETO DE ESTUDIO

El Perú por sus características climáticas y geográficas de ubicación está considerado como un país de alto riesgo en relación a las consecuencias desfavorables del cambio climático, en este contexto las poblaciones ubicadas en la zona sur del país, principalmente de las zonas altas, se encuentran más expuestas a sus efectos. Las estimaciones realizadas consideran que por efecto del cambio climático se reducirá la producción ganadera entre 3 a 6% dependiendo del tipo de sistema productivo siendo mayor en sistemas pastoriles lo que puede afectar su viabilidad y sostenibilidad.

Este hecho se ve agravado por que la mayor parte de los sistemas de crianza son bajo condiciones de pastoreo, con el uso de especies forrajeras nativas como base de la alimentación que presentan limitaciones nutricionales y productivas (condicionadas por factores de orden climático), que inciden directamente sobre la productividad de los animales, puesto que conllevan al ineficiente uso de los limitados recursos forrajeros por los animales, que se traducen en mayores ineficiencias digestivas y mayores pérdidas energéticas en el proceso de fermentación ruminal con la mayor emisión de gases de efecto invernadero, principalmente de CH₄ y CO₂.

En la actualidad no se cuenta con información de los niveles de emisión de metano (línea base) y la manera como esta se ve influenciada por el sistema de crianza actual a 4 300 m de altitud, limitando la sistematización de información necesaria para poder establecer medidas de mitigación en el presente y el futuro.

1.1. OBJETIVO Y JUSTIFICACIÓN

1.1.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la emisión de metano en vacunos bajo condiciones de pastoreo y con suplementación (ensilado y taninos) en el Centro Experimental “La Raya” a 4 300 m.s.n.m. durante la época de secas del 2015.

1.1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Determinar la cantidad de metano (factores de emisión) producido en vacunos en condiciones de pastoreo y suplementación bajo la técnica del trazado por SF₆ a nivel TIER 3.
- 2) Determinar el valor energético de los alimentos consumidos.

1.2. HIPÓTESIS

Ha: Las emisiones de metano se ven influenciadas por el tipo de alimentación de las vacas.

Ho: Las emisiones de metano no se ven influenciadas por el tipo de alimentación de las vacas.

1.3. JUSTIFICACIÓN

Los sistemas de producción ganadera en el Perú se sustentan en la utilización de los pastizales, cuyas características productivas y nutricionales se ven fuertemente condicionadas por la época del año (lluvias y seca) que en la actualidad vienen siendo alteradas por el cambio climático y que inciden directamente sobre la sostenibilidad de

los sistemas de producción animal (que determinan mayores emisiones de metano) y por ende sobre la economía de las familias que se dedican a esta actividad y que representan un porcentaje elevado de la población.

La mayor parte de los sistemas de crianza son bajo condiciones de pastoreo con pastura nativa por tanto es importante conocer la real dimensión de la utilización y aprovechamiento de estos nutrientes en el animal teniendo en cuenta el efecto negativo que puede generar estos pastizales en la producción de metano (CH₄) por las mayores ineficiencias digestivas y pérdidas energéticas en el proceso de fermentación ruminal.

Se tiene conocimiento y se viene trabajando intensamente para el desarrollo estrategias de mitigación alguna de ellas es la utilización de suplementos y aditivos nutricionales como el uso de alimentos concentrados y balanceados pero sus características están relacionados directamente con el orden económico por tanto se trata de establecer en primera línea que tan eficiente puede ser la utilización de estos suplementos.

Es por ello que en el estudio se busca evaluar los niveles de emisión de metano específicos por la actividad pecuaria de los vacunos en la zona alto andina del país y los factores que inciden sobre la misma y, que permitan en el futuro tener un inventario adecuado por regiones y/o zonas para realizar acciones de mitigación tendientes a reducir estas emisiones y hacer más eficientes a los animales en el uso de los recursos forrajeros.

CAPITULO III

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. SISTEMA DE ALIMENTACIÓN DE VACUNOS ALTO ANDINOS

Existe una gran variabilidad de sistemas de producción alto andinos que incluyen el componente pecuario.

La región andina del Perú está conformada por la cordillera de los Andes, que corre del sur a norte de nuestro territorio y está ubicado entre la costa y la selva. Se estima que en el Perú la superficie ocupada con pastos naturales alto andinos es de 20 887 000 ha. Los cuales soportan el 84% de la ganadería nacional. Más del 50 % de los sitios de los pastizales se encuentran en condición pobre y muy pobre, como consecuencia del sobre pastoreo y de las deficientes prácticas de manejo que se emplean (Flores y Zegarra, 1999).

Los pastizales se encuentran mayormente en las comunidades campesinas y en menor cantidad en pequeños fundos privados; que son el único sustento con que cuentan los camélidos principalmente para su alimentación (Flores y Malpartida, 1987).

2.1.1. Los pastizales en los sistemas de producción

Alimento para el ganado: Con pocas excepciones de unidades especializadas, la alimentación se hace con base en pastizales (>99%). En la mayoría de los casos (95%) se trata de praderas naturales y residuos de cosecha; el resto está constituido por pasturas y cultivos forrajeros. Las praderas nativas constituyen la principal fuente de

recursos forrajeros para la población ganadera del país, ya que el 100 % de la población de alpacas y vicuñas, el 98 % de ovinos, 86% de equinos y 80 % de vacunos pastorean en ellas (Flórez, 2005).

2.1.2. Relación: Crecimiento de la planta y ambiente

En las especies alto andinas se observan eventos fenológicos, estos se hallan finamente ajustados a las condiciones medio ambientales imperantes en el espacio alto andino. La germinación o rebrote se produce cuando las condiciones medio ambientales son favorables en los meses de octubre, noviembre y diciembre; la elongación en Enero, inicio del espigado y floración en enero y febrero, fructificación en abril y diseminación en mayo; para finalmente ingresar a una etapa de hibernación o dormancia (etapa donde no se tiene crecimiento), entre los meses de junio a setiembre. Las hojas que no fueron pastoreadas se secan, se tornan amarillas y no fotosintetizan; otros que si han sido pastoreadas y no tienen tallos ni hojas, por tanto, tampoco fotosintetizan, de manera de que en ambos casos, el rebrote dependerá de la energía contenida en las sustancias de reserva (carbohidratos) ubicados en las raíces coronas, base del tallo, etc.(Farfán y Farfán, 2012).

2.1.3. Calidad nutricional de los pastos naturales

El valor nutritivo es un concepto amplio en la cual está implicada la composición del alimento y su digestibilidad según Farfán y Farfán (2012). La importancia que posee, está dada por una relación directa con la respuesta animal esperada. Se habla de forrajes de alta calidad nutritiva cuando estas tienen alta concentración de

nutrientes, son muy digeribles y permiten un consumo elevado. Para entender el valor nutritivo de los forrajes es importante conocer las estructuras de la célula vegetal.

- **Pared celular:** Contiene la fracción fibrosa de los forrajes, la cual está conformada por tres componentes principales que son: la celulosa y hemicelulosa (32-35% de MS), ambas digeribles a nivel ruminal y lignina (3-7% de MS), que es indigerible. Al incrementar el estado de madurez de las plantas, la proporción de pared celular y su grado de lignificación aumentan, disminuyendo la digestibilidad de los tejidos vegetales. La fracción fibrosa de la pared celular (celulosa, hemicelulosa y lignina) se estima en el laboratorio a través de la Fibra Detergente Neutro (FDN). Un segundo indicador del contenido de fibra es la denominada Fibra Detergente Acido (FDA), que cuantifica la porción menos digerible de la pared celular (lignina y celulosa).
- **Contenido celular:** Se encuentra la mayoría de nutrientes digeribles para el animal, tales como proteínas, carbohidratos no estructurales, ácidos grasos, minerales y vitaminas. El contenido celular puede representar cerca del 65% de la MS de los tejidos vegetales jóvenes, pero disminuye a menos del 50% a medida que aumenta la proporción de pared celular, con el avance de la madurez de las plantas. Las proteínas y los carbohidratos no estructurales son los principales componentes de la MS presente en el contenido celular. Ambas tienen una rápida y completa digestión en el rumen, la que alcanza un 100% en los azúcares. Dependiendo del estado de madurez del forraje, el contenido de proteína puede variar entre 7 y 30 % de la materia seca. Los carbohidratos no estructurales (CNE) incluyen, azúcares, fructosanos y almidón, son altamente

digestibles y constituyen la mayor fuente de energía rápidamente disponible para el animal. Comprenden un 5 y 25 % de la MS, registrándose los valores máximos durante la época lluviosa en la sierra.

➤ **Indicadores de la calidad nutritiva**

- **Contenido de materia seca:** Las praderas en estado vegetativo tienen, en general, una muy buena concentración de MS (14 a 16%), la que aumenta de 18 a 25 % o más al estado reproductivo.
- **Contenido de fibra:** El material fibroso es de más lenta digestión y evacuación del rumen, por lo que ejerce un efecto físico de llenado que limita el consumo, mientras incrementa el nivel de fibra de un forraje decrece su consumo de materia seca.
- **Digestibilidad del forraje:** La digestibilidad del forraje puede variar de 55 a 85% dependiendo de múltiples factores, pero lo más importante es que se asocian al estado de madurez de la planta.
- **Energía metabolizable:** La energía metabolizable (EM) corresponde a la energía presente en la porción digestible de la planta menos la pérdida de energía a través de la orina y gas metano producido durante la fermentación ruminal; la energía utilizada para la mantención de la energía corporal y para la producción animal se llama energía neta (EN).
- **Proteína:** La fracción más importante de la proteína verdadera de los forrajes corresponde a la proteína degradable en el rumen, la que es utilizada junto con

el nitrógeno no proteico por los microorganismos ruminales, para la síntesis de la proteína microbiana (PM). Tanto la PM sintetizada en el rumen, como aquella no degradable, son utilizadas por el rumiante para cubrir sus necesidades de aminoácidos, los que son absorbidos a nivel intestinal a ella se denomina proteína metabolizable.

Huisa *et al.* (1985) en praderas nativas en la época seca encontró que el contenido de proteína cruda varía entre 5,7 a 10,8%; siendo mayor durante los meses de mayo y noviembre (10,8 y 10,81% respectivamente). Con relación a la digestibilidad no existe mucha diferencia entre un mes seco que es mayo (66,19%) y un mes húmedo como es noviembre (67,40%).

2.2.EFECTOS DE LOS GASES DE EFECTO INVERNADERO SOBRE LOS SISTEMAS DE PRODUCCIÓN

2.2.1. Cambio climático y gases de efecto invernadero

Uno de los problemas que actualmente enfrenta el planeta es el del calentamiento global, consecuencia del cambio climático, debido al aumento del efecto invernadero causado por la acumulación de gases que atrapan el calor en la atmósfera (Soliva y Hess, 2007).

En los últimos años, las concentraciones atmosféricas de los gases de efecto invernadero (GEI) a saber, el dióxido de carbono (CO₂), metano (CH₄) y óxido nitroso (N₂O) han aumentado a niveles sin precedentes. En 2011, las concentraciones de estos gases de efecto invernadero eran de 391 ppm 11,1803 ppm y 324 ppmm,

respectivamente, valores que excedían los niveles preindustriales en aproximadamente el 40%, el 150% y el 20%, respectivamente (IPCC, 2013).

El aumento de la concentración de los GEIs en la atmósfera está incrementando la temperatura en la Tierra y las estimaciones realizadas a través de modelos indican, para algunos escenarios de emisiones futuras, que antes de fin de siglo el aumento será del orden de 2 a 6 °C (Forster *et al.*, 2007, IPCC 2007). Las observaciones directas de cambio recientes, a escala global y regional son el aumento de las temperaturas medias en el aire y en los océanos, el derretimiento de nieve y hielos, y el aumento del nivel medio del mar.

Aunque el CO₂ es uno de los GEI más abundante y con mayor aporte al incremento del calentamiento global, las emisiones de metano, gas que posee un potencial de calentamiento de 21 a 30 veces mayor que el CO₂, se han venido incrementando aceleradamente en las últimas décadas (Carmona *et al.*, 2005). Otros autores reportan que el metano (CH₄) tiene un potencial de efecto invernadero 25 veces mayor que el CO₂ (IPCC, 2007).

Según expertos del IPCC, algo más de la mitad de las emisiones actuales de CH₄ son de origen antropógeno generadas principalmente por el uso de combustibles fósiles, actividades ganaderas, actividades agrícolas (cultivo del arroz) y por los vertederos de residuos y desechos (IPCC, 2007). Es estimado que la Agricultura representa alrededor del 10 al 12 % de las emisiones totales de GEI a la atmósfera (Smith *et al.*, 2007).

La contribución del Grupo de trabajo I al Quinto Informe de Evaluación del Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático (IPCC) pública en el 2013, menciona que se ha detectado la influencia humana en el calentamiento de la atmósfera y el océano, en alteraciones en el ciclo global del agua, en reducciones de la cantidad de nieve y hielo, en la elevación media mundial del nivel del mar y en cambios en algunos fenómenos climáticos extremos. Esta evidencia de la influencia humana es mayor desde que se elaborara el Cuarto Informe de Evaluación. Es sumamente probable que la influencia humana haya sido la causa dominante del calentamiento observado desde mediados del siglo XX.

Sin embargo el sector pecuario representa una fuente significativa de emisiones de gases de efecto invernadero (GEI) en todo el mundo, al generar dióxido de carbono (CO₂), metano (CH₄) y óxido nitroso (N₂O) a lo largo del proceso productivo. El ganado contribuye con el cambio climático al emitir GEI, bien sea directamente (fermentación entérica o el estiércol) o indirectamente (actividades desarrolladas durante la producción de piensos y la conversión de bosques en pastizales). Se ha calculado, con base en el análisis del ciclo de vida, que el sector emite aproximadamente 7,1 gigatoneladas de CO₂-eq/año, o cerca del 18% del total de las emisiones de los GEI antropogénicas. (Steinfeld *et al.*, 2009).

Alrededor del 44 % de las emisiones del sector son en forma de CH₄. El porcentaje restante se distribuye en partes casi iguales entre el N₂O (29%) y el CO₂ (27%). Las cadenas de suministro ganadero emiten:

- 2 giga toneladas de CO₂-eq de CO₂ por año, o el 5% de emisiones de CO₂ antropógenas (IPCC, 2007).
- 3.1 giga toneladas de CO₂-eq de CH₄ por año, o el 44% de emisiones de CH₄ antropógenas (IPCC, 2007).
- 2 giga toneladas de CO₂-eq de N₂O por año, o el 53% de emisiones de N₂O antropógenas (IPCC, 2007).
- Las emisiones de hidrofluorocarburos (HFC) son marginales a nivel mundial.

2.2.2. Producción de metano por vacunos

Kurihara *et al.* (1999) y Johnson y Johnson (1995), señalan que las emisiones de gas metano por el ganado bovino, están estimadas en 58 millones de toneladas/año, lo que representa el 73% del total de emisiones (80 millones) de todas la especies domésticas. McCaughey *et al.* (1997) y Moss *et al.* (2000) indican que los animales domésticos, principalmente el ganado bovino son responsables de aproximadamente el 15% de la producción de metano global.

Se calcula que la cantidad de metano emitido a la atmósfera alcanza los 320 millones de toneladas/año (Van Aardenne *et al.*, 2001) del cual un 27% (86 millones de toneladas), serian producto de la fermentación entérica (FAO, 2009)

El metano producido por los bovinos en calidad de GEI, juega un papel cada vez más importante en relación con el calentamiento global dado que las concentraciones atmosféricas se han incrementado en aproximadamente 150% en los últimos 250 años (Marín, 2013).

El metano es producido durante el proceso digestivo de los rumiantes. La cantidad producida y excretada depende de factores nutricionales en el animal.

La dieta es el factor principal de la cantidad de las emisiones de metano. Aunque también las emisiones tienden a incrementar con la edad y tamaño del animal.

Las características de la dieta tienen un gran efecto en la producción de gas metano a nivel global, de ahí que países con pocas limitaciones alimentarias para sus ganados, reportan datos de menores emisiones de gas metano y mayores eficiencias energéticas.

Crutzen *et al.* (1986), corrobora lo anterior al mencionar que, en los países en vía de desarrollo, las emisiones son aproximadamente de 55 kg CH₄/año por animal, en contraste a lo reportado en países desarrollados, de 35 kg CH₄/año por animal.

En 1915 se reportaron valores de 4,8 y de 4,7 g de CH₄ producido por cada 100 g de carbohidratos digeridos ofrecidos en forma de forrajes, o una mezcla de forrajes y concentrado, respectivamente; y en 1919 se reportó una producción de CH₄ de 4,29 g por cada 100 g de carbohidratos digestibles por encima del nivel de mantenimiento. En 1945 se midió experimentalmente una tasa diaria de producción de CH₄ de 180 l/día en vacas secas con raciones de mantenimiento y de 280 l/día en vacas de lactantes con dietas de producción (Wolin, 1960)

Según Johnson y Johnson (1995), las vacas producen entre 250 y 500 litros de metano al día y Jouany (1994) indica que una vaca adulta puede producir alrededor de 300 a 600 l de CH₄/vaca/día. Otros autores reportan que el ganado bovino produce

alrededor de 150 a 420 l de CH₄/animal/día (Czerkawski, 1969; Holter y Young, 1992; McAllister *et al.*, 1996).

Adicionalmente, estiman de manera general que las vacas producen aproximadamente 23 g/kg MS (Moate, 2010).

Chase (2007) reporta emisiones de CH₄ de 587 l/vaca/día obtenidos para vacas norteamericanas, mediante el sistema de valoración proteica y energética desarrollado por la Universidad de Cornell, conocido como “Cornell Net Carbohydrate and Protein System (CNCPS)”, inclusive se estima que las emisiones pueden alcanzar los 793 l/animal/día, en vacas de muy alta producción.

Los trabajos realizados en Nueva Zelanda con vacas lecheras alimentadas con pastos subtropicales, registraron emisiones de 422 g/día (Ulyatt *et al.*, 2002)

Dini (2012) en su estudio realizado en Uruguay con vacas en pastoreo comparando una pastura rica en leguminosas (60% del total de materia seca) y otra pastura rica en gramíneas (76 % del total de materia seca) indica que la emisión de CH₄ por animal fue de 368 g/d el cual coincide con los reportados por Waghorn *et al.* (2003) y Westberg *et al.* (2001), los cuales están en el rango de 345-388 g. Así mismo, la emisión de CH₄ expresada por unidad de producción de leche fue 18,9 g/kg y no difirió entre tratamientos, del mismo modo la producción de CH₄ por unidad de consumo de materia seca fue de 22,2 g/kg en promedio y como porcentaje de energía bruta ingerida 6,6 % en promedio, valor que se encuentra dentro de lo que indica Johnson y Johnson (1995) de 2 y el 12%.

Marín (2013) encontró que las emisiones de CH₄ por animal al día, producto de la fermentación *in vitro* de pastos y dietas, ascienden a los 443,59 g y 648,80 g, respectivamente, a partir de la información generada como producto de la fermentación ruminal *in vitro* de los pastos y dietas del total de la población bovina lechera estudiada (208,128 cabezas) de Antioquia-Colombia las emisiones de CH₄ fue de 31,82 Gg/año y 46,08 Gg/año.

El análisis de varios experimentos en los que se midió la emisión de CH₄ a partir de distintos tipos de dietas (forrajes, mixtas y peletizadas), indicó que en cada tipo de dieta con un consumo a nivel de mantenimiento, la producción de CH₄ se incrementó a medida que aumentó la digestibilidad aparente de ésta; la producción media de CH₄ fue de 8,07 Kcal por cada 100 Kcal ingeridas, con una escala de 6,2 a 10,8, correspondiendo el valor más bajo a pasto festuca peletizado y el más alto a pulpa de remolacha como alimento único (Blaxter y Clapperton, 1965).

Vacas Friesian tuvieron menor emisión de CH₄ cuando se alimentaron con base en *Lotus corniculatus* comparadas con vacas alimentadas con ensilado de ryegrass (26,9 vs 35,1 g/kg MS y 378 vs 434 g/kg de sólidos en leche (Kamra *et al.*,2008).

A partir de ecuaciones predictivas, el IDEAM (2009) reportó que las emisiones de CH₄ producto de la fermentación entérica alcanzaron en promedio los 156,17 g/animal/día en ganado no lechero con un peso en pie promedio de 403,93 kg, razón por la cual se hizo los cálculos utilizando el “Factor de Emisión para Fermentación Entérica” recomendado por el IPCC (IPCC, 1997), que para este tipo de ganado y

América Latina es de 57. Este factor de emisión está calculado para vacas con producción promedio de 800 kg/año, (2,2 l/día).

García *et al.*(2007) para calcular las emisiones de CH₄ fueron convertidas al equivalente de CO₂ para multiplicar las emisiones anuales por 23 (IPCC,2001) y obtuvieron el inventario y distribución de los animales del Instituto Nacional de Estadísticas del Perú (INEI, 2007), como resultado obtuvieron que las emisiones de CH₄ provenientes del ganado en 2006 fue de 468,8 Gg (10,8 Mt CO₂ eq) y el estiércol contribuyó con 13,7 Gg/año (0,3 Mt CO₂ eq).El ganado vacuno con 64,3% es el principal contribuyente del total de emisiones de CH₄ seguido de las ovejas con 17,3%.

Berra *et al.*, (2007) para su investigación utilizó una vaca Holstein de 6 años con 550 kg en la unidad experimental del Instituto de Patobiología,INTA Castelar, alimentada con alfalfa y bromegrass *ad libitum*, de la cual hizo la colección de gas a partir de una fístula ruminal de 2 cm, para determinar concentraciones de metano 4 muestras fueron tomadas por encima del periodo de 24 horas; los resultados obtenidos fueron en promedio de 247 l/día indicando que esta es una técnica prometedora bajo condiciones de campo ya que están dentro de los valores reportados por Johnson y Johnson (1995).

La emisión de CH₄ también está influenciada por el rendimiento de leche y la vida útil de vacas ya que el incremento de rendimiento de leche decrece la vida útil de las vacas; el efecto dominante del alto rendimiento de leche comparado con la baja vida útil de las vacas lecheras fue encontrado por Rus *et al.*(2007) además por la energía

acumulada por leche producida. Pero no se encontró efecto por el rendimiento de leche que 8,000 kg FCM/vaca/año.

Swainson *et al.*,(2008) en su estudio comparativo entre vacas, ovejas y venados utilizó jalas metabólicas para medir la ingestión de materia seca individual, los animales fueron alimentados con ensilado de alfalfa y los cálculos usados para requerimientos de energía estuvieron basados en la alimentación estándar australiana para rumiantes y las mediciones de metano fueron hechas usando la técnica del SF₆, indicó que la ingesta de materia seca (MS) por kg de peso vivo fue mejor para vacunos (0,060 kg MS/kg PV^{0.75}) comparada con venados (0,046 kg MS/kg PV^{0.75}) y ovejas (0,048 kg MS/kg PV^{0.75}). La producción de metano de vacunos (140,4 gr CH₄/día) fue mejor comparada con de los venados y ovejas. El rendimiento de metano también fue diferente entre especies siendo el de mayor rendimiento los vacunos (20,6 g/kg MS).

El 35% de producción de CH₄ entérico proviene de sistemas pastoriles (Niggli *et al.*, 2009) y la literatura reporta que el consumo de materia seca es el principal factor que influye sobre la producción de CH₄ entérico (Buddle *et al.*, 2011)

Se estima que la formación de metano representa una pérdida de 7 al 10% de la ingesta de los rumiantes de la energía bruta (Moss y Givens, 1993), dependiendo del nivel de consumo de alimento, la composición de la dieta y la digestibilidad aparente de la energía alimentaria (Soliva y Hess, 2007). Según otros autores la pérdida de energía bruta por metano puede ser del 2% en animales alimentados con dietas ricas en granos y de alrededor del 12% en animales alimentados con pasturas de baja calidad. Esa

energía que se está perdiendo debería ser canalizada para mejorar la productividad de los animales y reducir las emisiones.

Muchos investigadores usando cámaras calorimétricas han mostrado que el rendimiento de CH₄ es aproximadamente 23 g CH₄/kg MS (Dijkstra *et al.*, 2011).

2.2.3. Relación entre el proceso digestivo y ruminal de los vacunos y su producción de metano

El metano y el dióxido de carbono son subproductos naturales de la fermentación microbiana de los carbohidratos y de los aminoácidos en el rumen y el intestino grueso de los animales de granja (FAO, 2013).

Según Murray *et al.* (1976) y Muñoz *et al.* (2012) las emisiones rectales representan alrededor del 2 al 3 por ciento del total de las emisiones de CH₄ de ovejas o vacas lecheras, por tanto aproximadamente el 98-99%% se expulsa por los pulmones y en el eructo (83% por eructación y 16% por exhalación), la eliminación de metano vía eructo se inicia a las cuatro semanas de vida, cuando los alimentos sólidos empiezan a ser retenidos en el retículo-rumen y a medida de que éste se va desarrollando la fermentación y la producción de gases va en aumento (Carmona *et al.*, 2005).

La producción de metano producto de la fermentación ruminal depende principalmente de la cantidad y calidad de alimento que afecta la tasa de digestión y la velocidad de paso en el proceso de fermentación (Van Soest, 1982), por otro lado Johnson y Johnson (1995) los factores responsables de las variaciones son los factores propuestos anteriormente e incluye la relación de ácidos grasos volátiles producidos.

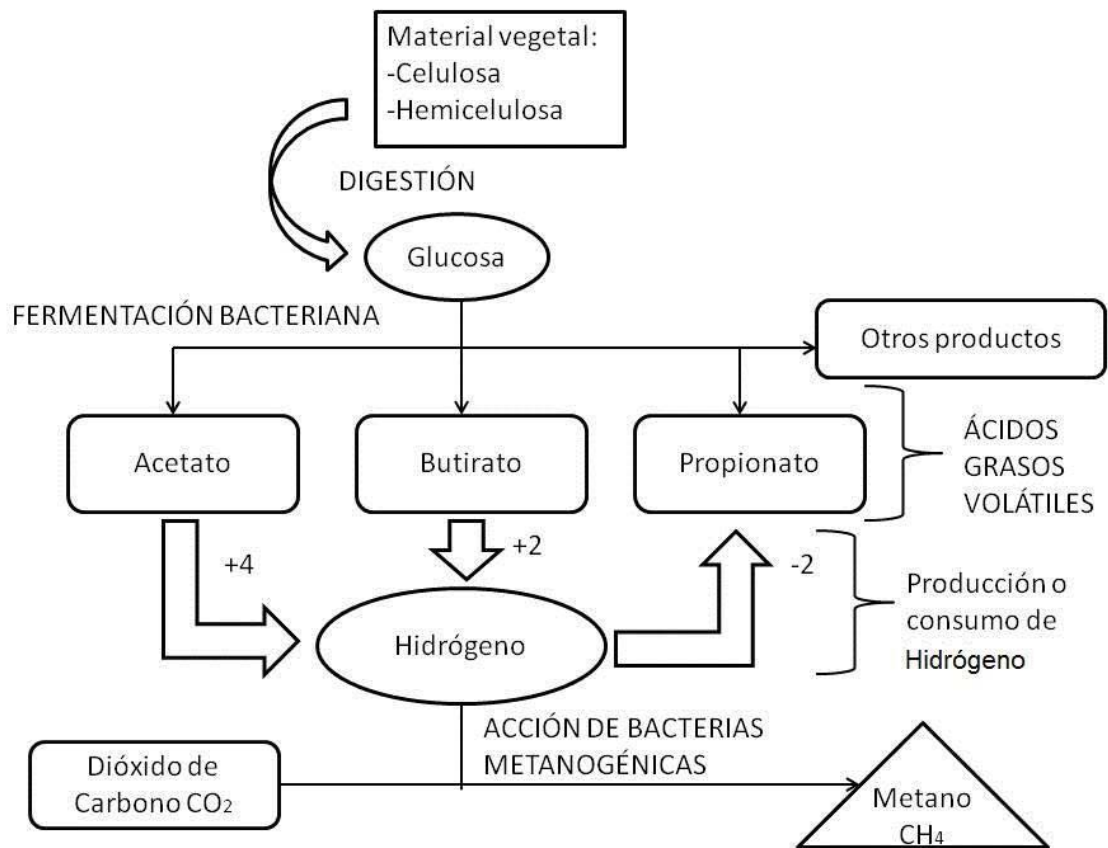
La metanogénesis del rumen cuenta aproximadamente como el 90% de la emisión de metano originado por rumiantes (Murray *et al.*, 1976). La digestión de alimentos por los microbios del rumen (archaea, bacterias, protozoos y hongos) bajo condiciones anaeróbicas resulta en la producción de ácidos grasos volátiles (AGV), amoníaco, dióxido de carbono y metano (Martin *et al.*, 2010, Carmona *et al.*, 2005). Teniendo presente que los AGV son utilizados por el animal como recurso de energía, los gases son eructados y no pueden ser utilizados.

El metano se produce en condiciones estrictamente anaeróbicas por procariotas metanógenas altamente especializadas, las cuales son todas *archaea* un grupo microbial muy distinto de las eubacterias (verdaderas bacterias) (Stewart, 1991; Van Soest, 1994; Weimer, 1998). Moss *et al.* (2000) señalan que unas y otras divergen en algunos aspectos, entre los que resaltan que las *Archaea* no tienen polímeros de peptidoglicanos en su pared celular y los lípidos intracelulares son diferentes en composición.

Las bacterias metanógenas dentro de las cuales se incluyen: *Methanobrevibacter ruminantium*, *Methanobacterium formicicum*, *Methanomicrobium mobile* (Stewart, 1991; Van Soest, 1994; Yokoyama y Johnson, 1993) constituyen una clase especial en la población ruminal por su papel en la regulación de la fermentación total al eliminar H₂. La reducción de CO₂ es el método primario por el que se produce CH₄ en el rumen, sin embargo algunas bacterias metanógenas como *Methanosarcina barkerii*, utilizan metanol, metilamina y acetato para producir CH₄. Al mantener baja la concentración de H₂, mediante la formación de CH₄, las bacterias metanógenas promueven el

crecimiento de otras especies bacterianas y permiten una fermentación más eficaz (Yokoyama y Johnson, 1993) (Figura 01).

Figura 1. Fermentación ruminal para la formación de metano



Fuente: Beauchemin y McGinn, 2011; citado por Muñoz, 2014.

Van Kessel y Russell (1995, 1996) indican que existe un efecto del pH en la relación de la producción de metano con el metabolismo ruminal de la misma manera señalan tres aspectos: 1) las bacterias metanógenas son sensibles a pH bajos, 2) la disminución en la relación acetato propionato dependiendo del pH es posiblemente causada por una inhibición de la metanogénesis y 3) la inhibición de la metanogénesis es causada por la toxicidad de los ácidos de la fermentación que se produce a un pH

bajo, Moss *et al.*, (2002) indican que las dietas basadas en forrajes con pH bajo se disminuye la metanogénesis independiente de la formación de propionato.

En el rumen la producción de metano se da principalmente por la primera vía, y la utiliza debido a que requiere menos tiempo para la generación de las poblaciones (4-12 h).



La segunda vía denominada acetoclástica, no tiene tanto efecto debido a que los tiempos de generación para las poblaciones metanógenas deben ser mayores (López *et al.*, 1998; Weimer, 1998).

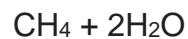
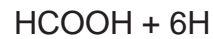


Van Soest (1994) describió la estequiometría general de las principales rutas de fermentación de los carbohidratos y la formación del producto final en el medio ambiente del rumen de la siguiente manera:



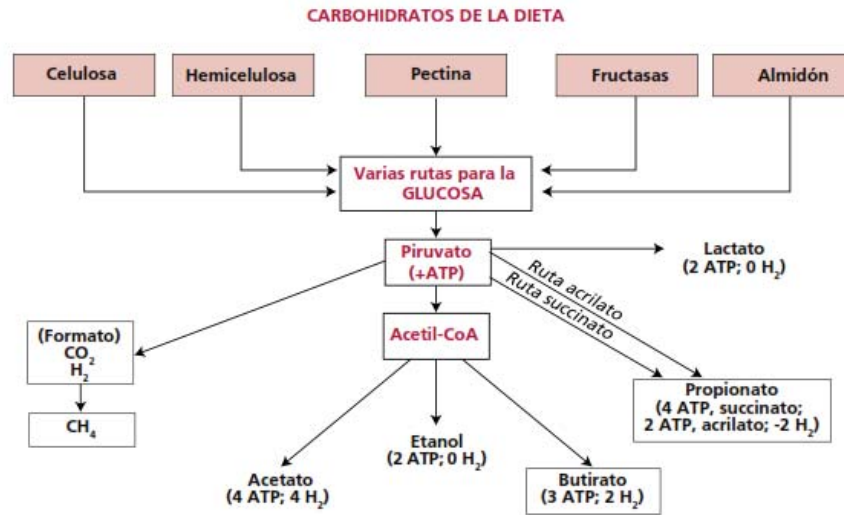
Así como se muestra en la Figura 01, los productos de la fermentación microbiana de los carbohidratos son los ácidos grasos volátiles (AGV), el metano (CH_4) y el dióxido de carbono (CO_2). Los alcoholes y el lactato también se forman durante este proceso, pero en general se reconoce que son de poca importancia en el rumen (excepto en los casos en que el lactato se acumula causando acidosis ruminal). Como

lo ha indicado Van Soest (1994), el problema básico en el metabolismo anaeróbico es el almacenamiento del oxígeno (es decir, como CO₂) y la eliminación de los equivalentes de hidrógeno (H₂) (es decir, como CH₄). El CH₄, formado a partir del CO₂ directamente o a través del formiato, que es el sumidero más importante de "2H" (el aceptor último de la reducción de los equivalentes de NADH+H₂, FADH₂, o ferredoxina reducida, comúnmente conocida como 2H porque pares de protones y electrones son donados y aceptados en las reacciones metabólicas) en el rumen:



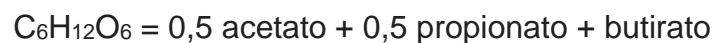
Los principales AGV (acetato, propionato y butirato) producen diversas cantidades de H₂ siendo el propionato un sumidero de 2H disminuyendo de este modo la cantidad total de 2H disponible para reducir el CO₂ en CH₄. El propionato se puede formar por dos vías diferentes, succinato y acrilato, siendo considerada la primera de gran importancia en el rumen (Russell y Wallace, 1997).

Figura 2. Metabolismo de los carbohidratos en el rumen



Fuente: Van Soest, 1994; Rusell y Wallace, 1997 citado por FAO, 2013

Estequiométricamente, 1 mol de acetato se puede originar de la fermentación de 0,5 moles de glucosa. Del mismo modo, 1 mol de propionato se puede formar a partir de 0,5 moles de glucosa, mientras que 1 mol de butirato se puede originar de 1 mol de glucosa. Por lo consiguiente la cantidad de glucosa (moles) fermentada será:



Asumiendo unas proporciones moleculares de AGV de 0,65 (acetato), 0,20 (propionato) y 0,15 (butirato), sobre la base de las ecuación anterior 1 mol de AGV total surge de la fermentación de 0,575 moles de glucosa y se asocia con 0,60 moles de CO₂ y 0,35 moles de CH₄. En otras palabras, en este ejemplo, 1 mol de glucosa produce 0,61 moles de CH₄ (Van Soest, 1994; Wolin, 1960).

Los protozoos ruminales también juegan un papel importante en la producción de metano, particularmente cuando el ganado es alimentado con dietas altas en

concentrado. Las bacterias metanógenas se han observado adheridas a especies protozoales, sugiriendo esto una posible transferencia interespecífica de H₂ (Johnson y Johnson, 1995; Moss *et al.*, 2000).

Diversos autores citados por Fonty (1991) y Dehority y Tirabasso (2000), mencionan un sinergismo entre algunos hongos y bacterias metanógenas, señalando que estas asociaciones incrementan los hongos, la tasa de hidrólisis y degradación de la celulosa. También se ha encontrado que esta asociación incrementa la producción de acetato a expensas de la reducción de lactato y etanol.

2.3. ESTRATEGIAS DE MITIGACIÓN DE LAS EMISIONES DE METANO

Existen diferentes estrategias de mitigación las cuales se agrupan en las siguientes categorías:

2.3.1. Suplementos y aditivos alimenticios

2.3.1.1. Inhibidores

Dentro de este grupo se encuentran los compuestos más exitosos probados *in vivo* el bromoclorometano (BCM), el 2-bromoetano sulfónico (BES), el cloroformo y la ciclodextrina; los cuales pueden reducir la producción de metano en un 50%, el problema con el BCM, a pesar de ser un excelente inhibidor, es un compuesto que agota la capa de ozono por tanto no es aceptado en muchos países (Histrov, *et al.*, 2013; FAO, 2013).

2.3.1.2. Aceptores de electrones

Los agentes más estudiados han sido el fumarato, los nitratos, los sulfatos y el nitroetano (Gutierrez-Banuelos *et al.*, 2007; Brown *et al.*, 2011), con los nitratos se reporta una disminución de hasta un 50% de la producción de metano; uno de los problemas al utilizar este compuesto es su baja capacidad de adaptación al medio ruminal, su alta toxicidad y su corta duración una vez retirado el compuesto de la dieta. En el caso del fumarato se observó una reducción de hasta el 76% de la producción de metano (Wood *et al.*, 2009) siempre y cuando el compuesto esté encapsulado y se suministre en grandes cantidades, ya que en forma libre no afectó significativamente la producción del gas, al ser ácido orgánico se considera seguro para la alimentación.

2.3.1.3. Ionóforos

La monensina ha sido el ionóforo más estudiado y se usa rutinariamente en la producción de carne y más recientemente en la nutrición de bovinos de leche en Norte América, en la década de los 80s se reportó que la monensina sódica disminuía la producción de metano hasta en un 25% (Bonilla y Lemus, 2011). Este compuesto puede mejorar la eficiencia alimenticia, disminuir la relación acetato: propionato, lo que podría concluir en una reducción de la producción de metano teniendo en cuenta la dosis, la reducción en el consumo de alimento y la composición de la dieta (Histrov, *et al.*, 2013; FAO, 2013; Johnson y Johnson, 1995; Moss *et al.*, 2000). Por otro lado Van Soest (1994), señala que los ionóforos no son inhibidores directos de las bacterias metanógenas los cuales restringen la producción de hidrógeno y por ende la producción de metano.

2.3.1.4. Compuestos bioactivos de las plantas

Esta categoría comprende una variedad de compuestos secundarios de las plantas, específicamente taninos, saponinas, aceites esenciales y sus ingredientes activos (Histrov, *et al.*, 2013; FAO, 2013).

2.3.1.4.1. Saponinas

Este grupo es de gran importancia ya que su efecto anti protozario se atribuye al enlace de las saponinas con el colesterol de la membrana celular del protozario, causando su lisis, y ya que un aproximado de 25% de las bacterias metanogénicas están en simbiosis con los protozoarios ciliados productores de hidrógeno, la inhibición de la metanogénesis se atribuye a su efecto con los protozoarios y las bacterias celulolíticas, reduciendo la disponibilidad de hidrógeno para la metanogénesis (Kamra *et al.*, 2008; Hegarty, 2007).

2.3.1.4.2. Aceites esenciales

Algunos aceites como el cinamaldehido, el aceite de ajo y el aceite de junípero demuestran que la población de *Archaea* no se ve afectada al utilizar estos compuestos, según el análisis filogenético estas bacterias metanogénicas incrementan su diversidad con relación a *Methanosphaera stadtmanae*, *Methanobrevibacter smithii*. En el caso del aceite de menta la producción de metano se reduce hasta un 75.6% (Bonilla y Lemus, 2011).

2.3.1.4.3. Taninos

Este grupo se considera uno de los más importantes y junto a las saponinas muestran el potencial de mitigación más promisorio dentro de esta categoría. Los taníferos como aditivos alimenticios o como plantas taníferas pueden reducir las emisiones de metano entérico de 20% hasta un 30%.

Los taninos son polifenoles capaces de ligarse a compuestos de la dieta (proteínas, carbohidratos) (Cortés *et al.*, 2009; Patra y Saxena, 2010; Jakmola *et al.*, 2010). Esto podría disminuir la degradabilidad de algunos nutrientes de la dieta, inhibir la actividad enzimática, disminuir las poblaciones de protozoarios o de bacterias celulolíticas y en consecuencia disminuir la producción de metano (McSweeney *et al.*, 2001; Tavendale *et al.*, 2005; Johnson *et al.*, 2007; Tiemann *et al.*, 2008; Hess *et al.*, 2008; Jakmola *et al.*, 2010). Basado en su estructura molecular los taninos son clasificados en hidrosolubles (poliésteres de ácido gálico y varios azúcares) y taninos condensados (polímeros y flavonoides). Hay algunos taninos que representa una combinación de dos estructuras (McSweeney *et al.*, 2001).

Los taninos condensados e hidrolizables se encuentran distribuidos ampliamente en las ramas y en los forrajes presentes en los climas cálidos, usualmente con considerados anti nutricionales, y poseen un buen potencial frente a parásitos (Niezen *et al.*, 1995, 1998; Terrill *et al.*, 1992).

Algunos de los taninos pueden reducir la cantidad de proteína degradada en el rumen e incrementar la demanda de proteína en el intestino (McSweeney *et al.*, 2001;

Waghorn *et al.*, 1987). Generalmente los taninos resultan en la excreción de nitrógeno baja por vía urinaria y alta por excreción fecal.

Los efectos de los taninos pueden resultar en un rápido índice de progreso en el peso vivo, altos rendimientos de leche, incremento de la fertilidad, y como ya se ha mencionado antes previene la infecciones por parásitos internos o hinchazón (Mueller-Harvey, 2006). Por otro lado también ha sido demostrado que el consumo de alimento, digestibilidad de proteína y materia seca, ganancia de peso vivo, rendimiento de leche pueden ser afectados negativamente por los taninos (Jansman,1993 ; Kumar y Singh, 1984; Reed, 1995).

Los taninos condensados (TC), comúnmente encontrado en la madera de las plantas leñosas, reducen la metanogénesis ruminal mediante la disminución de la formación de hidrógeno e inhibiendo a los metanogénicos, reducción en la degradabilidad de la materia seca (Tirmann *et al.*, 2008; Patra y Saxena, 2011).

Waghorn (2008) y Bouchard (2011) sugieren que la respuesta del animal al consumo de taninos es dependiente de la concentración de éstos en la dieta, reportándose efectos benéficos cuando la concentración varía entre 2 y 4% y menor con inclusiones mayores a 6%.

Se ha observado que la incorporación en concentraciones por debajo de 50 g de taninos condensados por kg de MS optimiza la digestibilidad de los alimentos en rumiantes, a consecuencia de una disminución de la degradación proteica en el rumen, que acarrea un aumento del flujo de aminoácidos disponibles de ser absorbidos en el

intestino delgado (Waghorn *et al.*, 1987; Barry y Blaney, 1987; Schwab, 1995; Berry y Mc Nabb, 1999)

Woodward *et al.* (2001) reporta que la producción de metano de vacas se vio reducida en un 23% por kg/MS consumiendo ensilado de loto (*Lotus Corniculatus*) a comparación con el consumo de ensilado de rye- grass.

Wischer *et al.* (2012) utilizó diferentes extractos de taninos polifenoles (castaña, semilla de uva, avellana, zumaque, quebracho, tara, valonea, roble, cocoa) en condiciones *in vitro* (Rusitec). La castaña reporta un decline en la producción de metano en un 63% con una inclusión de 10% del extracto en la dieta (1,5 g a 15 g de ensilado), seguido de la valonea (35%), la semilla de uva (23%), zumaque (18%). En cuanto a los ácidos grasos volátiles el extracto de castaña reduce la producción de acetato por 19% mientras que la semilla de uva y la avellana incrementa significativamente el acetato en un 22% y 13% respectivamente comparada con el tratamiento control y una reducción de 8% en la degradación de proteína cruda con el extracto de castaña incubado en el Rusitec, en cuanto a la prueba *in vivo* la reducción fue de 17%.

Perna *et al.*, (2013) al medir el efecto de los taninos (100 gr/animal/día obtenido de extracto de acacia) y la monensina, utilizando seis vacas canuladas en el rumen y la técnica del SF₆ para determinar la producción de metano, reportó que los taninos fueron menos efectivos en reducir la producción de metano (334 g/d, 19,9 g/kg MS).

Las plantas taníferas tropicales como *Leucaena leucocephala*, *Glyricida sepium* y *Manihot esculenta* fueron evaluadas para determinar la producción de metano mediante la técnica del SF₆ y población metanogénica, protozoaria y de bacterias celulolíticas, los

estudios dieron como resultado que la producción de metano por consumo de kg/MS de las plantas taníferas fueron más bajos que con el grupo control que no contenía taninos y un bajo efecto de *Glyricida sepium* en cuanto a la reducción de producción de metano y puede ser atribuido a la baja concentración de taninos en la planta (Rira *et al.*,2013).

Valencia *et al.* (2016) indican que la inclusión del 30% de *Leucaena leucocephala* en *Megathyrus maximus* redujo la emisión de metano (*in vitro*) en un 29% de gr MS/d.

En búsqueda por encontrar el potencial de otros fenoles para mitigar las emisiones de metano, Soliva *et al.*(2016),realizaron un estudio con ácido tánico el cual redujo 17% con una dosis de 10 mg agregados a 200 mg de rye grass.

Hess *et al.* (2002) señalan que los taninos presentes en muchas leguminosas, como *Calliandra calothyrsus*, pueden reducir la producción de metano en un 50%, sin embargo también reportaron que con especies como *Cratylia argétea* y *Arachis pintoi* incrementaron los niveles de metano hasta 3-4 veces con respecto al control.

No se tiene conocimiento de alguna comparación para medir la eficiencia entre los taninos que constituyen parte del alimento y aquellos que son suministrados como aditivo de la dieta (extractos), pero Waghorn y Jones (1989) demostraron que el tanino condensado de una planta se enlazó con las proteínas de otra y esto afectó su digestión, y que tanto las plantas como los extractos suplementarios fueron eficaces.

2.3.1.5. Lípidos dietéticos

Los aceites vegetales o grasas animales también pueden suprimir la producción de metano en el rumen (9-20%). Los piensos provenientes de subproductos con alto

contenido de aceite, como los granos de destilería y las harinas de la industria del biodiesel pueden ser una fuente eficaz de lípidos con potencial efecto supresor del CH₄ mediante la hidrogenación de los ácidos grasos insaturados, el aumento en la producción de ácido propiónico y la inhibición de protozoos (Histrov *et al.*, 2013; Johnson y Johnson, 1995). Sin embargo no se ha establecido bien el potencial de mitigación y en algunos casos podrían aumentar la producción de metano debido al incremento en el consumo de fibra (Histrov *et al.*, 2013; FAO, 2013).

2.3.1.6. Agentes microbianos en la alimentación

La adición de agentes microbianos en la alimentación en forma directa como suplemento es muy común en la producción animal. Los agentes microbianos en la alimentación más usados en la nutrición de rumiantes son los productos basados en levaduras, estos compuestos parecen estabilizar el pH y estimular la función del rumen, especialmente en el ganado lechero, lo que genera respuestas pequeñas pero consistentes en la productividad animal y en la eficiencia alimenticia, lo que podría significar una reducción moderada de la intensidad de las emisiones de CH₄.

2.3.1.7. Desfaunación

Morgavi *et al.*(2010) calcularon que con la desfaunación se lograba una disminución media de la producción de metano cercana al 10% pero los datos fueron extremadamente variables, se han establecido asociaciones y alimentación cruzada entre los protozoarios y las arqueas del rumen (Vogels *et al.*, 1980; Lee *et al.*, 1987; Finlay *et al.*, 1994), una reducción en la población de protozoarios y sus metanógenos asociados puede desencadenar un aumento de la población de bacterias o de los

metanógenos asociados al fluido ruminal, contrarrestando así el potencial de la desfaunación para reducir las emisiones de metano (Histrov *et al.*, 2013; FAO, 2013).

2.3.1.8. Manipulación de las arqueas y de las bacterias del rumen

Las vacunas contra las arqueas se basan en suministrar anticuerpos al rumen a través de la saliva, estas vacunas han sido exitosas *in vitro* (Wedlock *et al.*, 2010), para que las vacunas sean efectivas deben cubrir la totalidad de la comunidad metanogénica, la reducción de la metanogénesis es del 5 al 10% y se desconoce la persistencia del efecto.

2.3.2. Alimentos y gestión de la alimentación

Generalmente se cree que una inclusión más alta de granos en la dieta de los rumiantes disminuye la producción de metano entérico. Pelletier *et al.* (2010) observaron que las emisiones totales de GEI de bovinos de carne en fase de finalización en sistema de pastoreo extensivo fueron un 30% más alta que aquellas del ganado consumiendo raciones a base de cereales en corrales de engorde.

2.3.2.1. Concentrado

El efecto de disminuir la intensidad de las emisiones de metano dependerá del nivel de inclusión, la respuesta en la producción, los efectos sobre la digestibilidad de la fibra, la función del rumen, el contenido de grasa de la leche, el tipo de grano y su procesamiento. La reducción de metano se debe a que aunque haya una inclusión de concentrado en pequeñas cantidades probablemente incrementará la productividad animal. Uno de los problemas con el uso de concentrado como opción de mitigación es

que para muchos países no es económicamente y no es aceptado por los productores, además de que es posible que no sea un sustituto viable de los forrajes de alta calidad.

2.3.2.2. Calidad y manejo del forraje

La calidad del forraje, el nivel de concentrado, la digestibilidad de la dieta y el consumo de alimento están interrelacionados y afectan directamente la producción de metano en el rumen, según Blaxter y Clapperton (1965), el aumento del consumo de piensos de baja calidad y menos digestibles tiene poco efecto en la producción de metano cuando se expresa con base en el consumo de materia seca, sin embargo si los alimentos cuentan con una digestibilidad más alta aumenta el consumo de alimento por tanto una baja producción de metano.

2.4. TÉCNICAS DE MEDICIÓN DE METANO

Las técnicas analíticas para la determinación del CH₄ comprenden: espectroscopia infrarroja, cromatografía de gases, espectroscopia de masa y técnicas de diodo laser (Johnson y Johnson, 1995). Es importante comprender las ventajas y desventajas de los diferentes métodos en uso. Los métodos mejor sabidos son las cámaras de respiración, la técnica del SF₆, CO₂ y la estimación *in vitro*.

2.4.1. Calorimetría (Cámaras abiertas, cerradas o cámaras de respiración)

La producción de CH₄ ha sido medida en circuitos cerrados desde hace poco más de cuatro décadas (Blaxter y Clapperton, 1965; McLean, 1972; Kelly *et al.*, 1994; Johnson y Johnson, 1995; DeRamus, 2003). También se han construido cámaras hasta cierto punto rústicas para pequeños rumiantes utilizando materiales e instrumentos de

uso común, en las que fue posible identificar diferencias en la producción de CH₄ debidas a la dieta (Abdalla *et al.*, 2007).

Actualmente la mayor instalación experimental en el hemisferio Sur para la medición de emisión de gases por rumiantes se encuentra en las instalaciones de calorimetría animal del AG Grasslands Research Center, localizado en Palmerston North, Nueva Zelanda (Pinares-Patiño *et al.*, 2008).

La pérdida de metano es una parte inevitable del metabolismo energético en rumiantes, y los tipos diversos de cámaras son herramientas valiosas en la investigación de estrategias de mitigación para emisiones de metano (Storm *et al.*, 2012)

El principio de las cámaras es recoger todo aliento exhalado en el animal y su medida como la concentración de metano. Los sistemas calorimétricos, donde la composición de aire es medida, están divididos en dos tipos principales: El circuito cerrado (Wainman *et al.*, 1958) y el circuito abierto (siendo éste el más dominante) (Mclean y Tobin, 1987). En el circuito abierto una bomba bombea aire de la cámara a través de un medidor de flujo y los diferentes sensores del gas, el aire fresco del animal sale para afuera, en algunos sistemas el aire fresco sale a través de un sistema del aire acondicionado para controlar humedad, temperatura y la mezcla de aire en la cámara pero el aire puede también simplemente tomado fuera de la cámara (Mclean y Tobin, 1987).

La emisión de metano se calcula del flujo y la concentración del gas y de la conexión de la cámara, pero cálculos más complejos han sido desarrollados los cuales

también toman en cuenta las pequeñas diferencias en el flujo de entrada, de salida y los cambios en la cámara de las concentraciones de gases (Brown *et al.*,1958)

Otra ventaja de la calorimetría, es que provee información de la variabilidad de las emisiones durante el día por animal y entre animales (Grainger *et al.*,2007).

En conclusión, el sistema de cámaras pueden ser usados para examinar de cerca todos los aspectos de nutrición, consideraciones acerca del diseño de las cámaras pueden eliminar el riesgo de reducir el consumo de alimentos. No hay duda que el sistema da una medida cuantitativa de emisión de metano con baja tolerancia pero los costos de implementación y limitada capacidad del sistema restringe el número de animales que puedan ser examinados experimentalmente (Storm *et al.*, 2012).

2.4.2. Gases trazadores (Técnica del trazador SF₆)

Este método es relativamente nuevo y fue descrito por primera vez en 1993-1994 (Johnson *et al.*, 1994; Zimmerman, 1993). El principal propósito de este método fue para investigar la eficacia energética en ganado al pastoreo (Zimmerman, 1993) a causa de que fue puesto en duda que los resultados obtenidos en las cámaras de respiración no pueden ser aplicadas en ganado al pastoreo (Johnson *et al.*, 1994; Okelly, 1992), esta es una de las ventajas de esta técnica (Pinares-Patiño *et al.*, 2007).

Sin embargo algunos investigadores han cuestionado si existe diferencias en los valores obtenidos en pastoreo, para lo cual han realizado comparaciones entre ambas técnicas (Pinares-Patiño *et al.* 2011, Grainger *et al.*, 2007; McGinn *et al.*, 2006; Lassey, 2007; Boadi y Wittenberg, 2002; Johnson y Johnson 1995; Johnson *et al.*, 1994).El

método del hexafluoruro de azufre (SF₆ por sus siglas en inglés) es usado ampliamente en Nueva Zelanda (Lassey *et al.*,2011; Lassey *et al.*,1997; Vlaming *et al.*, 2007,2008; Ramirez-Restrepo *et al.*,2010; Pinares-Patiño *et al.*, 2011), Canadá (McGinn *et al.*,2009; McCaughey *et al.*,1997), Australia (Grainger *et al.*,2010; Goopy y Hegarty, 2004), Brasil (Pedreira *et al.*, 2009), Francia (Pinares-Patiño *et al.*, 2007; Morgavi *et al.*, 2008), Irlanda (Wims *et al.*, 2010), y Estados Unidos (Johnson *et al.*,1994; Tekippe *et al.*,2011) y también países del norte de Europa como Suecia y Noruega emplean este método.

La idea básica detrás del método es que la emisión de metano puede ser medido si la tasa de liberación del gas trazador del rumen es conocida. Para este propósito un gas no - toxico (Lester y Greenberg, 1950; Johnson *et al.*,1992) fisiológicamente inerte y estable es requerido. Además, el gas debe mezclarse con el aire del rumen de la misma forma como el metano. El SF₆ fue escogido porque desempeña todas las funciones mencionadas, es barato, tiene una baja limitación de detección y es simple de analizar (Primavesi *et al.*, 2004; Zimmerman, 1993). En la metodología descrita por Johnson *et al.*(1994) es asumido que la emisión de SF₆ simula exactamente la emisión de CH₄, de esa manera, la tasa de dilución para SF₆ y CH₄ son idénticas. El transporte del gas del rumen fuera de la boca es dominado por concentraciones energéticas y eructo así que la difusión molecular es un componente irrelevante en el proceso de emisión. La tasa de emisión de metano puede ser luego calculada a partir de las concentraciones medidas de CH₄ y SF₆ y tasa liberada de SF₆.

$$Q_{CH_4} = Q_{SF_6} \times [CH_4]/[SF_6]$$

Cápsula emisora de SF₆.- El SF₆ líquido es llenado en pequeños tubos de acero inoxidable y sellado con una tuerca de ¼ que contiene un disco permeable de teflón. Los tubos de permeación recientemente preparados son ubicados en una baño de temperatura a 39°C y pesado rutinariamente hasta una tasa de pérdida exacta determinada (500-1000 ng de SF₆ /min). Estos dispositivos son colocados en el rumen de la vaca con un disparador de bolos (Johnson *et al.*, 1994).

Aparato de muestreo.- El aparato de muestreo consiste de un contenedor de colección de acero inoxidable de 1-L y un tubo capilar extendido desde el recipiente de colección a justo por encima de la boca y fosas nasales del animal. El recipiente es sujetado a un collar alrededor del cuello de la vaca; el tubo de acero inoxidable con un diámetro interno de 0,005 sirve como una línea transmisora. Antes de tomar las muestras se genera vacío en el recipiente de colección (< 200 μ m). Para iniciar la colección de muestras, el recipiente colector es sujeto al collar y conectado a la línea transmisora, y una válvula en el recipiente de colección es abierta. El recipiente vaciado fue llenado a una tasa constante hasta que este alcance cerca de 0,5 atm, y cuando el tiempo de colección es finalizado la válvula del recipiente es cerrada. El tiempo de muestreo es controlado por el largo de la línea capilar transmisora. Se coloca un filtro (50 μ m) en el extremo final de la línea capilar para protegerla del taponamiento. Antes de analizar el metano y SF₆, el recipiente debe ser presurizado a 1,5 atm aproximadamente con nitrógeno.

A través de los años por facilidades de manejo y costo el aparato de muestreo ha tenido algunas adaptaciones a partir del modelo propuesto por Johnson (1994), se vienen probando diferentes diseños en términos de materiales como es el PVC y acero

inoxidable con diferentes formas (tanque “U”, tanque “V”, cilindro y tubo) con capacidades o volumen que van desde 0,5 a 2,5 l (Figura 03), los cuales han sido utilizados por la mayoría de investigadores (Lasseby *et al.*, 1997 ; Lovett *et al.*, 2003; McGinn *et al.*, 2006; Grainger *et al.*, 2007) e instituciones en diferentes partes del mundo (Agriculture and Agri-Food, Canadá ; INRA Herbivores, Francia; Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires, Argentina; Department of Primary Industries, Victoria, Australia; Teagasc and University College Dublin, Irlanda; NIWA and AgResearch, Nueva Zelanda) han modificado sus recipientes tomando en cuenta la forma, volumen, material y tiempo de colección (Cuadro 01) (Berndt *et al.*,2014; Dini, 2012; Muñoz, 2014).

Figura 3. Formas de los recipientes de colección (tanques)



Fuente: Muñoz,2014; Deighton *et al.*, 2014; Berndt *et al.*, 2014

Cuadro 1. Resumen de las modificaciones del recipiente de colección usando la técnica del SF₆

MATERIAL	FORMA	VOLUMEN (L)	COLECCIÓN (d)	UBICACIÓN
PVC	Yugo "U"	2.0	1	Agriculture and Agri-Food, Canadá
PVC	Yugo "V" o cilindro	0.75 ó 2.5	0.5 - 1	INRA Herbivores, Francia
Acero inoxidable	Cilindro	0.5	1 - 5	Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires, Argentina
Acero inoxidable	Cilindro	0.8	1	Department of Primary Industries, Victoria, Australia
PVC	Yugo "U"	2.14	1	Teagasc and University College Dublin, Irlanda
PVC	Yugo "V"	2.5	1	NIWA and AgResearch, Nueva Zelanda

Fuente: Deighton et al., 2014; Berndt et al., 2014

Figura 4. Modelos de aparatos de muestreo



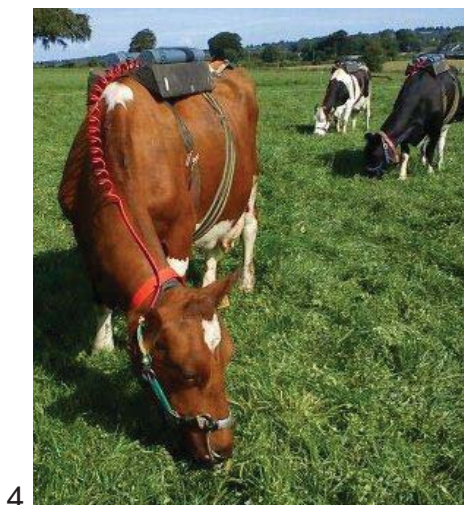
1. *Agriculture and Agri-Food Canadá, Semi-arid Prairie Agricultural Research Centre.*
2. *Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires, Argentina.*
3. *Department of Environment and Primary Industries, Ellinbank, Victoria, Australia.*

Fuente: Deighton et al., 2014; Berndt et al., 2014

También se ha modificado la forma de llevar los recipientes de colección, algunos centros de investigación (Teagasc and University College Dublin, Irlanda; Department of Environment and Primary Industries, Victoria, Australia) han optado por colocar la montura en la espalda del animal (Figura 05) y otros centros colocan los recipientes en el cuello (Department of Environment and Primary Industries, Victoria, Australia) y en la jácquima (Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires; Department of Environment and Primary Industries, Victoria, Australia)(Deighton *et al.*, 2014; Berndt *et al.*, 2014) (Figura 04).

Figura 5. Diferentes posiciones de los recipientes de colección





4.



5.

1,3,5. Department of Environment and Primary Industries, Victoria, Australia.

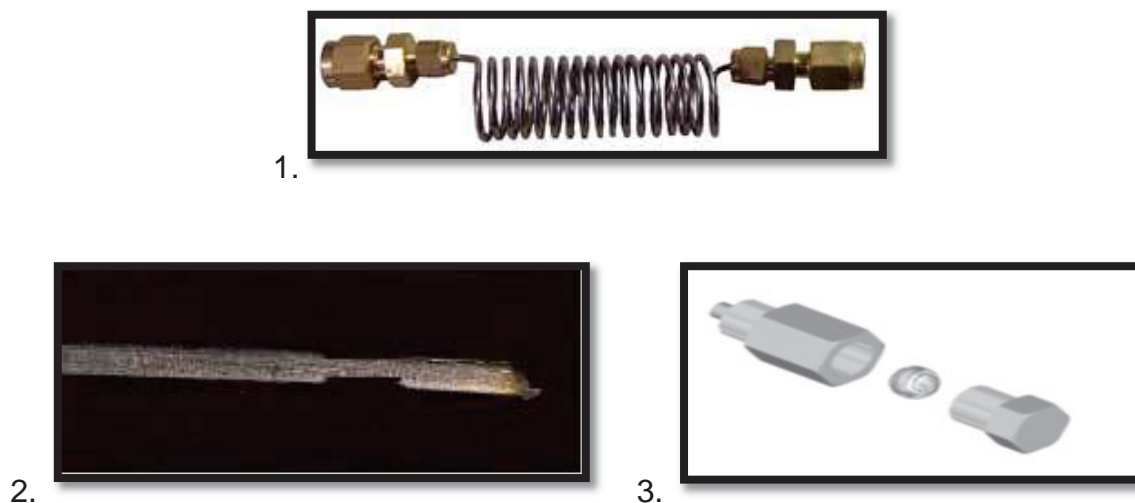
2,4. Teagasc and University College Dublin, Irlanda; Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires.

Fuente: Deighton et al., 2014; Berndt et al., 2014

Otra modificación de gran interés de la técnica del SF₆ es el empleo de un capilar diferente, en la técnica original ya descrita, se usa un capilar de acero inoxidable en donde la restricción está dada por la longitud y diámetro del capilar (Johnson *et al.*, 2007), si el muestreo es en periodos cortos (1 h) se usa un capilar pequeño, pero si el periodo de muestreo es de 24 h este debe ser más largo (1 m). Una modificación fue realizada por el grupo de Físico-química Ambiental de la Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires (UNICEN), la modificación propuesta radica en el uso de dispositivos ajustados por la compresión de una bolilla de acero contra el borde de un orificio cilíndrico, al disminuir la tasa de ingreso de aire al recipiente, generó la posibilidad de extenderlos periodos de muestreos por varios días. Gere y Gratton (2010); Gere *et al.*(2007) también hicieron una modificación al capilar usado por Johnson *et al.*, 1994, el capilar es corto y ajustado en uno de sus extremos para reducir la tasa de flujo recomendado por el AFBI (vacunos: 0,45 – 0,55 ml/min; ovinos: 0,35 –

0,45 ml/min) el capilar se introduce a un filtro de humedad (Berndt *et al.*, 2014; Dini, 2012; AFBI, 2011) (Figura 06).

Figura 6. Formas de capilares usados para la restricción de flujo



1. *Tubo capilar* - Johnson *et al.*, 1994.

2. *Capilar ajustado* - Wims *et al.*, 2010.

3. *Bolilla de acero* - Gere and Gratton, 2010.

Fuente: Deighton *et al.*, 2014; Berndt *et al.*, 2014

Análisis de metano.- El aire del recipiente de colección se pasa a través de un circuito de muestreo adjunto a un cromatógrafo de gas (GC). El sistema del GC consiste en un circuito de muestreo, una columna de 1/8 de diámetro interno x 4 pies, y un detector de ionización de flama, las corridas de los análisis se duplican o triplican con una reproducibilidad generalmente menor que 2%. La calibración del GC está basado en estándares secundarios (1.83 ppm de metano) para los chequeos de rutina.

Análisis de SF₆ .- Un cromatógrafo de gas de captura de electrones es empleado para este análisis. El sistema emplea un circuito de muestreo de gas de 1,0

ml, una columna Colador Molecular 5^a (1/8 diámetro interno x 6 pies), y un detector de laminilla de tritio, el GC tiene un bajo límite de detección de alrededor de 5 pptv, la calibración del sistema para analizar el SF₆ es finalizado con una serie de estándares de diferentes niveles de SF₆ (rango de 29 a 3000 pptv SF₆).

Esta técnica tiene la ventaja de que puede usarse en condiciones normales de pastoreo y se puede obtener información individual de los animales, lo cual permite efectuar diversos tipos de comparaciones; es una buena herramienta para países cuyas emisiones de CH₄ deriven principalmente de ganado en pastoreo, ya que se pueden obtener estimados precisos de las emisiones y desarrollar así opciones apropiadas de mitigación (Ulyatt *et al.*, 1999). Sin embargo, las técnicas con gases trazadores están asociadas a mayor variación que las técnicas calorimétricas estandarizadas (Pinares-Patiño *et al.*, 2008).

2.4.3. Óxido nitroso (N₂O)

El N₂O se usa como trazador, el cual es liberado a una tasa conocida (aproximadamente 10 g/h de cada contenedor). La tasa de emisión de CH₄ de los animales se determina a partir de la relación de la concentración CH₄:NO₂ y la tasa conocida de liberación del N₂O. Esta metodología es capaz de cuantificar simultáneamente ambos gases en la corriente de aire. Se han hecho ensayos con vacas Holstein en lactancia monitoreándolas continuamente (excepto a la hora del ordeño) durante cuatro días en pequeñas áreas de pastoreo cercadas, realizando al mismo tiempo el monitoreo con SF₆, habiendo obtenido excelente concordancia entre ambas técnicas (Tonini *et al.*, 2007).

2.4.4. La técnica del CO₂

La técnica de usar el CO₂ como gas trazador es un método útil ya que en lugar de usar SF₆ agregado externamente se puede usar el CO₂ emitido naturalmente para cuantificar la emisión de CH₄. La proporción de CH₄/CO₂ en la producción de aire del animal en cuestión es medido como intervalos regulares y combinado con la producción de CO₂ diaria del animal calculada. Los cálculos son los mismos que los usados para SF₆, solo que CO₂ como gas trazador en lugar del SF₆.

El aire expirado del ganado contiene CO₂ y CH₄ en concentraciones de 100 y 1000 veces más altas que las concentraciones del aire atmosférico, respectivamente. Sin embargo es sólo necesario tener 5-10 % del aliento del animal en el aire que será analizado (Storm *et al.*, 2012).

Medidas de CH₄ y CO₂ pueden ser conducidas con diferentes tipos de análisis, utilizando un equipo portable llamado Gasmeter (Gasmeter Technologies Oy, Helsinki, Finland), que está basada en medidas infrarrojas (Fourier Transformed Infrared (FTIR) Teye *et al.*, 2009).

La ventaja de este método es que el equipo es portable y puede ser fácilmente usado bajo diferentes circunstancias; la principal desventaja es que la producción de CO₂ de los animales es influenciada por el tamaño y la actividad que desarrollan (Storm *et al.*, 2012).

2.4.5. Colecta directa

En Argentina se ha ensayado una técnica para colectar el gas producido en el rumen, mediante una fístula de 2 cm de diámetro, a través de la cual fluye el gas a un contenedor de nylon, tipo globo fijado al lomo, en este caso de una vaca Holstein de 550 Kg. Una vez colectado el gas por periodos de 24 h se determina su concentración de CH₄ en intervalos de 6 h. La producción diaria de gas fue en promedio de 911,7 l y la concentración de CH₄ varió de 20 a 32 % y representó en promedio 247 l/d (Berra *et al.*, 2007).

2.4.6. Técnica de producción de gas *in vitro*

Esta técnica ha sido usada para simular la fermentación ruminal de alimento y forraje por décadas (Rymer *et al.*, 2005).

El principio básico de esta técnica es fermentar alimento bajo condiciones controladas de laboratorio empleando microorganismos naturales del rumen. Por ejemplo forrajes es sometido a diferentes tratamientos, son incubados a 39° con una mezcla de fluidos del rumen, sustancia buffer y minerales por un por un cierto periodo de tiempo, usualmente a 24, 48, 72, 96 ó 144 h. La cantidad del total del gas producido durante incubación es medido y su composición analizada, para obtener la información de la producción de metano producido (Storm *et al.*, 2012).

El método requiere acceso a fluido del rumen fresco, el cual es usualmente obtenido de vacas u otros rumiantes fistulados. Los métodos alternativos para la colección de fluido ruminal son por un tubo esofágico de animales vivos o sacrificados.

Una clara desventaja de ésta técnica es que sólo simula la fermentación ruminal del alimento, no las emisiones y digestibilidad total del animal. Más aun, bajo condiciones normales esto no incluye el largo plazo de adaptación de los microorganismos ruminales a los forrajes probados. Durante los experimentos en animales vivos es común practicar periodos de adaptación a nuevos alimentos al menos por 14 días. Para la población de microbios ruminales productores de metano, las indicaciones que los periodos de adaptación después del intercambio al nuevo alimento es más de 30 días (Williams *et al.*, 2009)

La ventaja es que es una técnica muy útil cuando primeras aproximaciones para probar el potencial de los forrajes y aditivos o cuando condiciones de incubación controladas son necesitadas. Los resultados de la técnica *in vitro* pueden ser usados para optimizar experimentos largos y más costosos en animales enteros (Storm *et al.*, 2012).

2.4.7. Modelos de predicción

Cuando es necesario medir el total de las emisiones de una nación se puede usar modelos basados en información existente como las características del animal (peso, raza), las características del alimento (nutriente y contenido energético), información de consumo (materia seca o nutrientes) o nutrientes digestibles. Así también los modelos usan información derivada de experimentos conductuales con ganado en cámaras de respiración, pero nunca nuevas técnicas como el SF₆ o CO₂ (Storm *et al.*, 2012).

2.4.7.1. IPCC

El modelo estándar para calcular las emisiones de metano del ganado es publicado por el IPCC, el cual opera con tres niveles diferentes para estimar emisiones de gases de efecto invernadero (IPCC, 2005). Estos tres niveles dependen de la calidad de la información establecida en el país en cuestión, y son conocidas como Tier 1,2 y 3. Los tres métodos están basados en la proporción del consumo de energía bruta del animal excretado como metano. Tier 1 de esa manera utiliza un factor de emisión de 6,5% (Y_m) y una energía bruta asumida. Cuando se usa Tier 2 y 3 es requerida más información. Los modelos son requeridos también para determinar el consumo de alimento y energía en relación a la producción de ganado de una región o país.

CAPITULO IV

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. ÁREA DE ESTUDIO

3.1.1. Ubicación política

El presente trabajo se realizó en el Centro Experimental “La Raya”; ubicado en el Distrito de Marangani, Provincia de Canchis a 178 km de la ciudad del Cusco a 4 313 m.s.n.m.; el análisis de muestras se realizó en el Laboratorio de Cambio Climático y Producción animal, Departamento Académico de Ganadería, Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco.

Región : Cusco
Departamento : Cusco
Provincia : Canchis
Distrito : Marangani

3.1.2. Ubicación geográfica

Altitud : 4 313 m
Límite con Laguna de Langui : X903705; Y8408031
Límite con Ayaviri : X939559; Y8411172
Punto de referencia (Marangani) : X921640; Y8407186

3.1.3. Límites

Norte	:	Marangani
Sur	:	Layo
Este	:	La Raya-UNA-PUNO
Oeste	:	Comunidad Campesina de Occobamba

3.2. DURACIÓN DEL TRABAJO

El presente trabajo tuvo una duración de nueve meses, iniciándose el mes de diciembre del 2014 finalizando el mes de marzo del 2016.

3.3. MATERIALES Y EQUIPOS

3.3.1. Material biológico:

- 05 Vacunos hembras raza Brown Swiss, cuyas características se presentan en el cuadro 02.

Cuadro 2. Características de las vacas utilizadas

Arete	Peso, kg	Condición	Fecha de nacimiento	Edad	Estado fisiológico
247	464	BLL	Setiembre/2006	9 años	En producción/vacía
237	440	BLL	Mayo/2006	9 años	En producción/vacía
272	400	BLL	Mayo/2007	8 años	En producción/vacía
277	426	BLL	Setiembre/2007	8 años	En producción/vacía
206	649	BLL	Mayo/2005	10 años	En producción/vacía

BLL: Boca Llena

Fuente: Elaboración propia.

- Muestras gaseosas provenientes del rumen de las vacas en mención.
- Muestras de pastos naturales.

3.3.2. Equipos

- Destilador (Marca GFL, serie 2004).
- Estufa de secado (Marca Memmert).
- Horno Mufla (Nabertherm 30-3000 °C).
- Cromatógrafo de gases equipado con detector de captura de electrones e ionización de llama (Perkin Elmer modelo Clarus 680).
- Congelador -10 a -25 °C (Biobase BXC-YL450).
- Ultracongeladora (- 86°C) (Binder UFV 500).
- Balanza electrónica de precisión de 0,0001 g (Sartorius modelo Quintix).
- Balanza digital de precisión 5 kg/1 g (Kern PCB versión 1.4).
- Ultramicrobalanza con precisión de 0,0001 mg (Perkin Elmer modelo AD 6000).
- Bomba de vacío (Sartorius).
- GPS (Garmin modelo Oregon 650).
- Flujómetro (Cole – Parmer M Series Gas Flow Meters).
- Bomba Calorimétrica (Parr modelo 6400).
- Analizador elemental (Perkin Elmer modelo 2400 serie II).
- Extractor de fluidos supercríticos (Waters MV10).
- Taladro de mesa.
- Loop para limpieza y evacuación de gases.
- Loop para generar vacío.

- Loop para calibrar capilares.

3.3.3. Materiales

- Segadera.
- Tijeras.
- Bolsas de polipropileno.
- Bolsas de papel.
- Aplicador de bolos.
- Tubos de PVC 3”.
- Codos de PVC.
- Pegamento.
- Cinta bovinométrica.

3.4. METODOLOGÍA

El estudio corresponde a una investigación cuantitativa de tipo correlacional causa-efecto.

Para el presente estudio se utilizó el método del SF₆ desarrollado por Kristen A. Johnson y Hal H. Westberg (1994) con modificaciones de acuerdo al lugar del estudio y disponibilidad de materiales.

3.4.1. Calibración de tubos de permeación

Los tubos de permeación utilizados fueron diseñados por Lassey *et al.*, (2001) basado en el propuesto por Johnson *et al.*, (1994) las características están descritas en el Cuadro 03.

Cuadro 3. Características generales de los tubos de permeación

Propiedad	Medida
Diámetro externo sin tuerca	14,3 mm
Tuerca Swagelok	15,9 mm
Diámetro interno	7,9 mm
Profundidad	38 mm
Volumen interno disponible para SF6	1,7 ml

Fuente: Deighton et al., 2014; Berndt et al., 2014.

El procedimiento utilizado para calibrar los tubos de permeación se realizó en dos etapas después de realizar el siguiente procedimiento:

- a) Pesaje de cada tubo de permeación en una balanza analítica (0,0001 g de precisión).
- b) Tomar datos de peso, día y la hora de pesaje.
- c) Calcular la tasa de liberación y longevidad esperada usando una línea de regresión.
- d) Revisar R^2 para asegurarse la tasa de liberación constante ($r^2 > 0,99$)

Primera etapa: El pesaje de cada tubo de permeación (25 unidades) fue realizado durante 52 semanas (febrero del 2014 a marzo del 2015), estos tubos no

fueron utilizados ya que los datos obtenidos al revisar la tasa de liberación no cumplían con los requisitos mínimos por lo tanto fueron descartados (Anexo I).

Segunda etapa: En esta etapa de calibración se utilizó otros 25 tubos de permeación los cuales estuvieron congelados a -86°C hasta el periodo de calibración que empezó cuando los tubos se acondicionaron a 39°C .

Los tubos fueron pesados durante 21 semanas (marzo a julio del 2015) de los cuales se seleccionaron se seleccionaron 4 tubos al ver que cumplían las condiciones mínimas para ser insertados en el rumen de los vacunos, estos tubos tienen las siguientes características que se presentan en el Cuadro 04.

Cuadro 4. Características de los tubos de permeación seleccionados

N°TUBO	Carga de SF₆ (mg)	Tasa de permeación (mg/d)	R²
A01	2,1530	1,711	0,09338
G3	2,0925	2,5929	0,99895
G27	1,9266	2,1470	0,99971
G18	2,1244	2,0483	0,99973

Fuente: Elaboración propia.

Figura 7. Pesaje de tubos de permeación



3.4.2. Construcción y evaluación de tanques

Los diseños elegidos para el aparato de colección fueron de dos tipos, el primero consiste en el tanque en forma de “V” de PVC con una capacidad de 2,5 l construido a partir de dos tubos de PVC de 500 mm de largo con diámetro de 63 mm unido con un codo usando pegamento especial para PVC, moldeado en un horno a 120°-135°C por 5-10 minutos, basado en el modelo modificado por NIWA y AgResearch-Nueva Zelanda (Figura 08), estos tanques fueron proporcionados por INIA Remehue– Chile.

Figura 8. Prueba de tanque en forma de “V” de PVC



El segundo diseño usado fue el tanque en forma de tubo de 2 l de capacidad, contruidos de la siguiente manera:

- a) Cortar los tubos de PVC de 3” de diámetro cada 40 cm.
- b) Lijar los extremos y pegar las tapas con pegamento especial para PVC.
- c) Dejar secar por 24 hrs, taladrar un extremo del tanque y colocar un conector hembra Swalegok unido a través de un codo y teflón de la misma marca.

El número de tanques en forma de “V” fue de 4; los tanques en forma de tubos de 2 l de capacidad fueron 98 de los cuales se seleccionaron 12 al hacer la evaluación.

Adicionalmente se construyeron 4 tanques con medida de 30 cm de largo (1,5 l de capacidad) para poder ser utilizados en el muestreo del ambiente.

El periodo de construcción de tanques fue durante el mes de febrero del 2015.

Figura 9. Construcción de tanques en forma de tubo



La evaluación de los tanques se realizó en tres etapas, la primera fue en laboratorio el cual se siguió de la siguiente manera:

- a)** Generar vacío a una presión de 600 mbar a cada tanque preparado a través del loop para generar vacío.
- b)** Evaluar a las 24, 48, 72, 96, 130 h (5 días)
- c)** Los tanques que tuvieron una pérdida de flujo mayor al 40% durante la evaluación fueron descartados (Anexo II).

La segunda evaluación se realizó a nivel de campo de los cuales los tanques en forma de “V” fueron descartados a los 2 días ya que presentaron fugas en este periodo, por lo tanto se tuvo que reemplazar por tanques con capacidad de 1,5 l.

3.4.3. Preparación y calibración de líneas capilares

3.4.3.1. Capilares

Se utilizaron capilares cortos de 3 cm de longitud, los cuales se obtuvieron a partir de cortar el rollo de capilar de acero inoxidable con 0,102 mm (proveniente del instituto AgResearch – Nueva Zelanda).

Los capilares tuvieron que ser ajustados a través de un flujómetro para que el flujo obtenido sea de 0,70 – 0,75 ml/min el cual se tomó a partir del flujo recomendado por el AFBI (Agri-Food and Biosciences Institute) que recomienda 0,45 – 0,55 ml/min en condiciones a nivel del mar.

3.4.3.2. Línea capilar

La línea capilar se construye a partir de una manguera de nylon de 1/8" de diámetro (proveniente del instituto AgResearch - Nueva Zelanda), esta manguera tiene en un extremo al capilar ya calibrado inserto dentro de un filtro de humedad unido a un conector "Y" de plástico. En el otro extremo de la manguera se colocó un conector macho Swalegok.

El periodo de construcción de la línea capilar fue desde el mes de marzo del 2015.

3.4.3.3. Evaluación de línea capilar

La evaluación se llevó a cabo durante el mes de abril del 2015, el procedimiento que se utilizó fue el siguiente (Figura 10):

- a) Generar vacío (600 mbar) a un tanque aprobado previa evaluación, a través de una bomba y un loop para generar vacío.
- b) Unir al tanque y revisar a las 24 h por un periodo de 5 días.
- c) Descartar las líneas que permitan que el tanque tenga una pérdida de flujo mayor al 10% (Anexo III).

Figura 10. Evaluación de líneas capilares



3.4.4. Adiestramiento de animales:

El adiestramiento de los animales consistió en seleccionar vacunos de acuerdo a la edad y peso tomados de los registros, tratando de que el lote sea homogéneo.

Los animales seleccionados según los registros fueron 23, de los cuales 13 vacas tenían la edad entre 4 y 5 años, las otras 10 vacas tenían una edad promedio de 8 años y medio como se muestra en el Anexo IV.

Una vez seleccionados los vacunos se procedió a adaptarlos al aparato de muestreo, en primer lugar fueron colocados las jáquimas de cuero el siguiente paso fue colocarles la mochila contenedora de tanques para poder hacer los ajustes en cuanto a medida y material de la misma, de este periodo se obtuvo un diseño de una mochila con medidas de 60 cm ancho por 40 cm de largo (Figura 11).

Figura 11. Adaptación de las vacas al aparato de muestreo



De los 23 vacunos seleccionados de acuerdo a la adaptación y acostumbramiento del aparato de muestreo se descartó todo el lote de las vacas con edad de 4 y 5 años, del segundo lote de 10 vacas con edad promedio de 8 años y medio fueron seleccionados 5 cuyas características fueron mostrados anteriormente (Cuadro 02).

Cuadro 2. Características de las vacas utilizadas

Arete	Peso, kg	Condición	Fecha de nacimiento	Edad	Estado fisiológico
247	464	BLL	Setiembre/2006	9 años	En producción/vacía
237	440	BLL	Mayo/2006	9 años	En producción/vacía
272	400	BLL	Mayo/2007	8 años	En producción/vacía
277	426	BLL	Setiembre/2007	8 años	En producción/vacía
206	649	BLL	Mayo/2005	10 años	En producción/vacía

BLL: Boca llena

Fuente: Elaboración propia.

El periodo de adiestramiento de los animales fue desde el mes de febrero a junio del 2015.

3.4.5. Aplicación de tubos de permeación

Los tubos de permeación fueron aplicados a 4 de las 5 vacas seleccionadas ya que una de ellas fue escogida para ser la muestra “Blanco”, cuadro 05.

Cuadro 5. Registro de aplicación de tubos a las vacas

Arete N°	Peso, kg	Hora	Cod.Tubo de SF₆
237	440	09:58 a.m.	A01
272	400	10:02 a.m.	G3
277	426	10:11 a.m.	G18
206	649	10:17 a.m.	G27

Fuente: Elaboración propia.

La aplicación de los tubos se realizó el 24 de julio del 2015.

3.4.6. Muestreo de campo

3.4.6.1. Muestreo de gases

Los gases provenientes del rumen de las vacas fueron contenidos en los tanques de colección por 24 h y transportados al Laboratorio de Cambio climático y producción animal ubicado en el Centro Agronómico K'ayra.

El periodo de muestreo de gases fue realizado en dos momentos de acuerdo al tratamiento, inicialmente el tratamiento con ensilado de avena comenzando desde el 4 al 8 de agosto del 2015, después de una pausa se retomó el muestreo desde el 12 al 21 de agosto del 2015, el tiempo total fue de 12 días de los cuales se descartaron los primeros 4 días.

Seguidamente el muestreo correspondiente al tratamiento con taninos se llevó a cabo desde el 10 al 18 de setiembre del 2015, teniendo un total de 8 días de muestreo.

3.4.6.2. Análisis cromatográfico

El Laboratorio de Cambio climático y producción animal cuenta con un cromatógrafo de gases marca Perkin Elmer, modelo Clarus 680, equipado con un detector de captura de electrones e ionización de llama, las columnas cromatográficas de 30 m x 0,53 mm de longitud, marca Supelco.

El análisis del SF₆ y CH₄ fue determinado en un periodo de tiempo de 15 minutos por muestra (Anexo V y VI).

3.4.7. Sistema de alimentación

La investigación se basa en la medición del metano en condiciones de pastoreo con suplementación nutricional por tanto a las vacas seleccionadas se le suministró adicionalmente taninos a su dieta basada en el consumo de pasto y ensilado de avena.

3.4.7.1. Suministro de ensilado

El ensilado de avena formó parte de la dieta de los vacunos debido a la temporada de evaluación (secas) en el cual los pastos naturales son insuficientes en cantidad y calidad por tanto se reduce su consumo.

Se proporcionó 25 kg/día de ensilado por vaca en promedio.

3.4.7.2. Aplicación de taninos

Se utilizó como aditivo nutricional el extracto en polvo de taninos hidrolizables de la madera del castaño, (comercializado por Silva Team).

Se suministró los taninos de castaño con mezcla de ensilado; para lo cual se tuvo que atar a las vacas al comedero cada día a las 8:00 am (después del ordeño).

El periodo de adaptación a la nueva mezcla fue de 5 días; en la cual se ofreció gradualmente el tanino desde 10 g/vaca/día hasta 40 g/día/vaca. Desde el 6° día se inicia la toma de muestras.

3.4.7.3. Consumo de pastura nativa

Las vacas seleccionadas fueron pastoreadas (durante el periodo experimental) en el Sector denominado “Huaracóni”, el cual fue elegido después de hacer el cálculo de disponibilidad forrajera (Cuadro 06) que se hizo tomando el área a través de un GPS, y las muestras visuales (99) arrojando el cuadrante al azar por toda la zona.

Cuadro 6. Disponibilidad forrajera sector Huaracóni

Área (ha)	Rdto, kg/ha	Rdto. total, kg	Tipo de pastizal
27,61	3 546,02	97 936	Chillihuar

Fuente: Elaboración propia.

3.4.7.4. Análisis de alimentos

El análisis de los resultados fue llevado a cabo en el Laboratorio de Cambio Climático y Producción animal (octubre del 2015 a marzo del 2016).

Se determinó la energía bruta, materia orgánica, materia seca, proteína de las muestras de pastos y ensilado de avena recolectados en el lugar de muestreo.

3.4.7.4.1. Energía bruta

El análisis de energía se realizó en una bomba calorimétrica marca Parr, modelo 6400. Las muestras de pastos y ensilado provenientes del lugar de estudio (Centro experimental “La Raya”) fueron procesadas en base a los requisitos que necesita la bomba calorimétrica, los cuales son:

- a) Las muestras deben estar molidas y secas para hacer pellets, el peso de los pellets deben ser 0,5000 a 1,5000 g.
- b) La muestra es ingresada al equipo, que a través de 25 a 30 atmosferas de oxígeno es quemada completamente en un periodo aproximado de 9 minutos.
- c) Al transcurrir los 9 minutos los resultados son expresados en cal/gr.

La fórmula que utiliza el equipo para la determinación de la EB es:

$$EB \text{ cal/gr} = \frac{WT - e1 - e2 - e3}{m}$$

Donde:

- W: Energía equivalente del calorímetro siendo usado.
- T: Incremento de temperatura.
- e1: Calor producido por quema de la porción de aire atrapado en la bomba en forma de ácido nítrico.
- e2: Calor producido por la formación de ácido sulfúrico.
- e3: Calor producido por el alambre (conductor eléctrico) y el hilo de algodón.
- m: Peso de la muestra.

3.4.7.4.2. Materia orgánica

El análisis fue realizado en un horno mufla a una temperatura de 600° C por un periodo de 10 hrs, el peso de la muestra seca y molida fue de 2 a 3 g.

La determinación de materia orgánica se hizo a través de la siguiente fórmula:

$$\% \text{ MO} = \frac{\text{Peso muestra seca} - \text{Peso ceniza}}{\text{Peso muestra seca}} * 100$$

3.4.7.4.3. Materia seca

El análisis fue realizado mediante un analizador de humedad, donde se ingresó aproximadamente 3 g de muestra picada, el resultado es expresado en porcentaje de humedad del cual se puede obtener la materia seca por diferencia:

$$\% \text{ MS} = 100 - \% \text{ Humedad}$$

Para que el resultado sea expresado en % Humedad el equipo sigue la siguiente fórmula:

$$\% \text{ H} = 100 - \frac{\text{Peso inicial} * 100}{\text{Peso final}}$$

3.4.7.4.4. Proteína

Se utilizó un analizador elemental de nitrógeno (marca Perkin Elmer, modelo 2400, serie II) el equipo requiere 2 mg de muestra en polvo el cual fue contenido en unos viales de 9 x 2 mm, la duración del análisis fue de 5 min/muestra, las condiciones de temperatura de combustión, reducción y del horno son de 950°, 640° y 82°C respectivamente.

Para determinar el porcentaje de la proteína cruda se siguió la siguiente fórmula:

$$\% \text{ PC} = \% \text{ Nitrógeno} * 6,25$$

3.4.8. Cálculo de metano (CH₄)

Para determinar la cantidad producida se utilizó el modelo de cálculo siguiente (INIA Remehue – Chile) (ver Anexo VII):

$$\text{CH}_4 \text{ (g/día)} = \frac{[\text{CH}_4 \text{ tanque} - \text{CH}_4 \text{ ambiente}]}{[\text{SF}_6 \text{ tanque} - \text{SF}_6 \text{ ambiente}]} * \text{SF}_6 \text{TP}$$

3.5. DISEÑO ESTADÍSTICO PARA EVALUACIÓN DE LOS RESULTADOS

El análisis de los resultados se hará en base a la estadística descriptiva, se aplicaran diseños experimentales de DCA y prueba de significancia de Duncan al 5% (Calzada, 1964).

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

Dónde:

Y_{ij} = Variable respuesta.

μ = La media general.

τ_i = El efecto del i-enésimo tratamiento (alimento).

ε_{ij} = El efecto del error experimental.

CAPÍTULO V

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. CANTIDAD DE METANO PRODUCIDO (CH₄, g/día)

Al análisis de varianza (ANVA) se encuentran diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$) (Anexo VIII) donde los mayores niveles de emisión se registraron con el tratamiento de ensilaje y pastos naturales sin la aplicación de taninos (Duncan 5%) lo que implicaría que la utilización de taninos permite reducir las emisiones de metano (Cuadro 07).

Cuadro 7. Metano producido por tratamiento (CH₄, g/día)

Tratamiento	Media	CV	D.E	Signif.
Ensilado	578,71	59,69	345,42	a
Taninos	415,91	29,31	121,92	b

Fuente: Elaboración propia.

Este hecho podría estar atribuido a que, como indican McSweeney *et al.*(2001), Tavendale *et al.*(2005), Johnson *et al.*(2007), Tiemann *et al.*(2008), Hess *et al.*(2008), Jakmola *et al.*(2010), Martin *et al.*(2010) y Ramírez-Restrepo y Barry (2005), los taninos disminuyen la degradabilidad de los nutrientes, inhiben la actividad enzimática, disminuyen las poblaciones de protozoarios y/o bacterias celulolíticas y forman enlaces con las proteínas del forraje reduciendo la degradación de la proteína ruminal, que es lo que habría sucedido en el presente estudio donde las emisiones de CH₄ se vieron disminuidas cuando las vacas consumieron taninos adicional a su dieta basada en ensilado y pastos naturales.

Los resultados de este estudio coinciden con lo reportado por autores como Woodward *et al.*(2001), Wischer *et al.*(2012), Perna *et al.*(2013), Rira *et al.*(2013), Hess *et al.*(2002), Giraldo *et al.*(2016), Soliva *et al.*(2016) y Barbaro *et al.*(2007), quienes al utilizar taninos redujeron las emisiones de metano.

Por otro lado se puede observar que el valor promedio de la emisión de CH₄/g/día del tratamiento con taninos es de 415,91 muy similar al valor obtenido por Ulyatt *et al.* (2002) en su estudio en Nueva Zelanda con pastos sub tropicales (422 CH₄, g/día), sin embargo es elevado comparado al valor obtenido por Perna *et al.*(2013) con 334 CH₄/g/día con taninos provenientes de Acacia.

Conjuntamente con el tratamiento del ensilado (578,71 CH₄, g/día) los valores están por encima de los valores reportados por Dini, 2012 (368 CH₄, g/día), Waghorn *et al.*, 2003; Westerg *et al.*, 2001 (345-388 CH₄, g/día) y Swainson *et al.*, 2008 (140 CH₄, g/día) en condiciones de pastoreo exclusivo y con la misma metodología utilizada en esta investigación.

Los datos obtenidos en este estudio también concuerdan con lo reportado por Bárbaro *et al.* (2007), quienes utilizaron taninos provenientes del quebracho logrando reducir las emisiones de CH₄, sin embargo los niveles de reducción en el caso argentino son mucho mayores que en el caso peruano, que bien es cierto en términos cuantitativos las emisiones son menores (119,09 CH₄, g/día) pero en términos porcentuales la reducción lograda en el presente estudio (28%) es mayor frente al otro (11,8%).

Probablemente estas variaciones se deberían a que la calidad nutricional (principalmente el contenido de fibra) de los pastos cultivados son menores a de los pastos naturales los cuales tienen un comportamiento parecido de las plantas C3 (gramíneas forrajeras) que según Hammond *et al.* (2011), Vlaming (2008), Waghorn y Woodward (2006), Ramírez-Restrepo y Barry (2005) y Waghorn *et al.* (2002), su consumo conduce a una mayor emisión de CH₄ comparado a la incorporación de pasturas de forrajes de alta calidad nutricional (leguminosas), cuando las pasturas son en base a gramíneas sembradas se da una mayor pérdida de energía bruta ingerida como CH₄ en relación a la obtenida en predominio de leguminosas, ya que, las gramíneas proporcionan mayores niveles de fibra que estimulan la rumia, menor tasa de pasaje y mayor tasa de fermentación, con altos niveles de acético e H₂ todo lo cual afecta la metanogénesis (Waghorn y Woodward, 2006), las variaciones de los resultados también se ven influenciadas por las características genéticas y peso vivo del animal.

4.2. CANTIDAD DE METANO PRODUCIDO (CH₄, l/día)

Al análisis de varianza (ANVA) se encuentran diferencias significativas ($p < 0,05$) donde el tratamiento con taninos fue menor respecto al tratamiento con ensilado (Anexos IX, Cuadro 08) los cuales tienen la misma tendencia de la cantidad de metano expresado en g/día.

Cuadro 8. Metano producido por tratamiento (CH₄, l/día)

Tratamiento	Media	CV	D.E	Signif.
Ensilado	882,54	59,69	526,76	a
Taninos	634,26	29,31	185,93	b

Fuente: Elaboración propia.

Los datos obtenidos para esta unidad de medida son para el caso del ensilado (882,54 CH₄, l/día) y para el tratamiento con taninos (634,26 CH₄, l/día), estos resultados son superiores a los reportados por Johnson y Johnson (1995), quienes son el referente para el presente estudio con una producción de 250 – 500 CH₄, l/día, Jouany (1994) indica una producción de 300 – 600 CH₄, l/día, Czerkawski (1969), Holter y Young (1992), Mc Allister *et al.*(1996) en sus investigaciones realizadas con la técnica *in vitro* (RUSITEC) con una dieta en base a forrajes reportaron 150 – 420 CH₄, l/día, por colección directa (fístula) Berra *et al.*(2007) indica que la producción fue de 247 CH₄, l/día con consumo de alfalfa y bromegrass.

Probablemente este hecho se debería principalmente al factor nutricional, como es explicado anteriormente, debido a la dieta consumida en base a pastura natural y ensilado de avena que contienen una baja calidad nutricional, por otro lado estas diferencias de resultados también puede ser atribuido a las diferentes técnicas de medición del metano.

4.3. CANTIDAD DE METANO PRODUCIDO (CH₄, g/kg PV/día)

Al análisis de varianza (ANVA) se encuentran diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los tratamientos (Anexo X, Cuadro 09) y con la prueba de significancia de Duncan

(5%) se observa que el tratamiento taninos es diferente (menor) al tratamiento con ensilado, lo que implicaría que la utilización de taninos permite reducir las emisiones de metano diaria en gramos por cada kilogramo de peso vivo de las vacas.

Cuadro 9. Metano producido por tratamiento (CH₄, g/kg PV/día)

Tratamiento	Media	CV	D.E	Signif.
Ensilado	1,53	84,15	1,28	a
Taninos	0,87	32,99	0,29	b

Fuente: Elaboración propia.

Según los datos la media del tratamiento con ensilado es 1,526 CH₄, g/kg PV/día, el cual es casi el doble de la media del tratamiento con taninos (0,870 CH₄, g/kg PV/día)

Por otro lado no se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) (Anexo XI) entre días de evaluación de cada tratamiento, lo cual es indicador que la producción de metano fue constante durante el periodo de evaluación.

4.4. CANTIDAD DE METANO PRODUCIDO (CH₄, g/kg PV^{0.75})

Al análisis de varianza (ANVA) y la prueba de significancia de Duncan (5%) no se encuentran diferencias significativas ($p > 0,05$) donde la respuesta metabólica muestra que no hay variación entre tratamientos (Anexo XII, Cuadro 10) sin embargo de acuerdo a los datos promedios se observa que el tratamiento taninos es relativamente menor al tratamiento con ensilado.

Cuadro 10. Metano producido por tratamiento (CH₄, g/kg PV^{0.75})

Tratamiento	Media	CV	D.E	Signif.
Ensilado	5,72	65,22	3,73	a
Taninos	4,06	31,88	1,30	a

Fuente: Elaboración propia.

4.5. CANTIDAD DE METANO PRODUCIDO (CH₄, g/kg MS)

Al análisis de varianza (ANVA) y prueba de Duncan al 5% no se encuentran diferencias significativas entre tratamientos ($p > 0.05$) (Anexo XIII, Cuadro 11) sin embargo los mayores niveles de emisión de metano fueron registrados con el tratamiento de ensilaje y pastos naturales sin la aplicación de taninos.

Cuadro 11. Metano producido por tratamiento (CH₄, g/kg MS)

Tratamiento	Media	CV	D.E	Signif.
Ensilado	41,08	67,24	27,62	a
Taninos	29,01	32,99	9,57	a

Fuente: Elaboración propia.

Los resultados de este estudio en el caso de ambos tratamientos son superiores a los reportados por autores como Pedreira *et al.*(2009) con 23.2 CH₄, g/kg MS y Cavanagh *et al.*(2008) con 18.2 CH₄, g/kg MS en vacas Jersey x Friesian.

Willen *et al.* (2011) en su estudio con una dieta en base a 25% de ensilado de hierba y 75% de ensilado de arveja/avena las vacas producen 29 g/kg MS concordando con lo reportado en este estudio con el tratamiento con taninos (29,01 CH₄, g/kg MS) sin

embargo es inferior a lo reportado con el tratamiento sólo con ensilado de avena (41,09 CH₄, g/kg MS).

Por otro lado se puede observar que el valor promedio de la emisión de CH₄, g/kg MS del tratamiento con taninos (29.01) es elevado comparado al valor obtenido (19.9 CH₄, g/kg MS) por Perna *et al.* (2013) y Woodward *et al.* (2001) el primero en su estudio con taninos provenientes del extracto de acacia y el segundo con la inclusión de plantas taníferas a la dieta (*Lotus corniculatus*), sin embargo desde el punto de vista mitigador se observa que este estudio concuerda con estos autores, quienes indican que existe una clara disminución de las emisiones de metano aplicando taninos frente a su tratamiento control.

4.6. ANÁLISIS NUTRICIONAL DE LOS ALIMENTOS CONSUMIDOS

4.6.1. ENERGIA BRUTA

Según los datos obtenidos para el presente estudio entre el contenido energético de los pastos y el ensilado de avena existe una ligera diferencia siendo el mayor el ensilado (4,05 kcal/g), por tanto la energía consumida en promedio fue 4,04 kcal/g.

4.6.2. MATERIA ORGÁNICA

Los resultados muestran el promedio de la materia orgánica de los pastos y el ensilado de avena 95,42%.

4.6.3. MATERIA SECA

El valor promedio del alimento consumido tiene 91,22 % de materia seca, notándose que la materia seca de los pastos es menor (89,60 %MS) al del ensilado de avena (92,84 %MS).

4.6.4. PROTEÍNA

El porcentaje de proteína cruda de los pastos es ligeramente superior (6,15%) al del ensilado (5,25%), siendo el promedio 5,70%.

Los resultados del análisis se presentan en el siguiente cuadro 12.

Cuadro 12. Análisis nutricional de los alimentos consumido por las vacas

ESPECIE	EB, kcal/g	%MO	%MS	%PC
Mulembergia fastigiata	4,01	-	89,79	-
Festuca ortophylla	4,07	96,22	89,64	3,25
Calamagrostis amoena	3,84	92,74	89,61	4,69
Stipa brachiphylla	4,06	96,36	89,23	3,81
Stipa ichu (vieja)	4,07	95,59	89,48	2,81
Festuca dolichophylla	3,81	96,44	89,17	4,31
Scirpus rigidus	4,08	96,71	89,91	10,19
Stipa ichu (joven)	4,04	97,21	89,77	2,44
Lolium perenne	4,01	95,12	89,81	11,06
Festuca rígida	4,01	94,94	89,84	5,38
Festuca dolichophylla (inflorescencia)	4,27	-	-	-
Festuca rígida (inflorescencia)	4,15	94,63	-	9,38
Calamagrostis amoena (inflorescencia)	4,09	94,43	-	10,38
Promedio pastos	4,04	95,49	89,60	6,15
<i>Silaje de avena</i>	4,05	95,35	92,84	5,25
Promedio pastos - silaje	4,04	95,42	91,22	5,70

EB=energía bruta; %MO= porcentaje de materia orgánica; %MS= porcentaje de materia seca; %PC= porcentaje de proteína cruda.

Fuente: Elaboración propia.

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES

Bajo las condiciones en las que se realizó el presente estudio, se concluye en lo siguiente:

1. La producción de metano en vacas con dieta a base de ensilado de avena y pastos naturales fue de 578,71 CH₄, g/día ó 882,54 CH₄, l/día en cuanto a la expresión CH₄ g, kg PV/día la producción fue 1,526 y por kilogramo de materia seca consumida fue 41,09 CH₄, g/kg MS.
2. La producción de metano en vacas con dieta a base de ensilado de avena, pastos naturales con la adición de taninos fue de 415,91 CH₄, g/día ó 634,26 CH₄, l/día en cuanto a la expresión CH₄ g, kg PV/día la producción fue 0,870 y por kilogramo de materia seca consumida fue 29,01 CH₄, g/kg MS.
3. Entre los días de evaluación para cada tratamiento no hubo variación de la producción de metano en el periodo experimental.
4. La utilización de taninos reduce la producción de metano (28%).

RECOMENDACIONES

1. Se recomienda emplear los taninos como aditivo a dietas que producen mayor cantidad de metano por su baja calidad nutricional.
2. Se sugiere seguir realizando estudios para establecer de mejor manera la dosis y la forma de inclusión de los taninos en un sistema de pastoreo.
3. Se sugiere realizar el presente estudio en época de lluvias.
4. Se recomienda mejorar las técnicas de muestreo con la utilización de sub muestreo (viales) para análisis posterior en laboratorio.
5. Se recomienda realizar estudios con la inclusión de una planta nativa de la zona como es el caso de la Q'euña.

CAPITULO VI

BIBLIOGRAFÍA

AGARWAL, CHAUDHARY LC, 2008. Effect of plant extracts on methanogenesis and microbial profile of the rumen of buffalo: a brief review. Aust J Exp Agric;(48):175-178.

ABDALLA AL, BUENO ICS, PEÇANHA MRSR, LONGO C, GODOY PB, SALLAM SMA, CASTI LHO LA, 2007. In vivo methane determination in a small chamber system. Proc Greenhouse Gases Anim Agric Conf (GGAAC). New Zeland.:xviii–xvii.

BÁRBARO N.O., GRATTON R., RUBIO R., GERE J. WILLIAMS K., ARGUELO G. y MANETTI M.,2007 Evaluación del efecto de un aditivo alimentario (en base a taninos) sobre las emisiones de CH₄ en vacas lecheras adultas mediante la técnica de trazado por SF₆ con largos tiempos de recolección.

BERRA G, VALTORTA SE, FINSTER L, MANGANO E, BARRERA F, FRAIGI L, 2007. A simple technique for measuring enteric methane emissions in cows. GGAAC. New Zeland.:xxvii–xxviii.

BLAXTER KL, CLAPPERTON JL, 1965. Prediction of the amount of methane produced by ruminants. Br J Nutr; 19:511–522

BERNDT, A., T. M. BOLAND, M. H. DEIGHTON, J. I. GERE, C. GRAINGER, R. S. HEGARTY, A. D.WAASA, J. P. KOOLAARD, K. R. LASSEY, D. LUO, R. J.

MARTIN, C. MARTIN, P. J. MOATE, G. MOLANO, C. PINARES-PATIÑO, B. E. RIBAU, N. M. SWAINSON, G. C. WAGHORN, AND S. R. O. WILLIAMS. 2014. Guidelines for use of sulphur hexafluoride (SF6) tracer technique to measure enteric methane emissions from ruminants. Pages 166. M. G. Lambert, ed. New Zealand Agricultural Greenhouse Gas Research Centre, New Zealand.

BONILLA J, LEMUS C, 2012. Emisión de metano entérico por rumiantes y su contribución al calentamiento global y al cambio climático. Revisión .GLOBALRev Mex Cienc Pecu;3(2):215-246

BROWN, D.; COLE, T.J.; DAUNCEY, M.J.; MARRS, R.W.; MURGATROYD, P.R, 1984. Analysis of gaseous exchange in open-circuit indirect calorimetry. Med. Biol. Eng. Comput., 22, 333–338.

CAVANAGH A.; MCNAUGHTON L.; CLARK H.; GREAVES C.; GOWAN JM; PINARES-PATIÑO C.; DALLEY D.; VLAMING B.; MOLANO G. 2008Metano emisiones pasten Jersey x vacas lecheras frisonas a mediados de la lactancia. Australian Journal of Experimental Agricultura, v.48, p.230-233.

DIJKSTRA, J, VAN ZIJDERVELD, S.M, APAJALAHTI, J.A, BANNINK, A, GERRITS, W.J.J, NEWBOLD, J.R, PERDOK, H.B & BERENDS, H, 2011. Relationships between methane production and milk

DINI VILAR YOANA, 2012. Emisión de metano entérico de vacas lecheras en pastoreo de praderas dominadas por gramíneas o por leguminosas. Tesis de Maestría.

- DEHORITY BA, TIRABASSO PA, 2000. Antibiosis between ruminal bacteria and ruminal fungi. *Appl Environ Microbiol*;66(7): 2921-2927.
- FAO, 2009. La larga sombra del ganado. Problemas ambientales y opciones p. 86-139, edited by H. Steinfeld, P. Gerber, T. Wassenaar, V. Castel, M. Rosales, and C. de Haan. Roma.
- FONTY G, 1991. The rumen anaerobic fungi. In: JOUANY, JP. Rumen microbial metabolism and ruminant digestion. INRA editions, Paris, France, pp 53-70.
- GARCIA MIRIAM, MALPARTIDA EFRAÍN, GOMEZ CARLOS, 2007. Estimate of methane emissions - enteric fermentation and manure management - from livestock in Perú.
- GRAINGER C, CLARKE T, MCGINN SM, AULDIST MJ, BEAUCHEMIN KA, HANNAH GC, WAGHORN GC, 2007. Methane emissions from dairy cows measured using the sulfur hexafluoride (SF₆) tracer and chamber techniques. *J Dairy Sci*;90:2755–2766.
- GRAINGER, C.; WILLIAMS, R.; CLARKE, T.; WRIGHT, A.D.G.; ECKARD, R.J., 2010. Supplementation with whole cottonseed causes long-term reduction of methane emissions from lactating dairy cows offered a forage and cereal grain diet. *J. Dairy Sci.* 93, 2612–2619.
- HEGARTY RS, 2007. Variante in protozoo populations in feedlot cattle and grazing sheep. GGAAC. New Zealand.

HRISTOV A. N, FIRKINS J. L, DIJKSTRA J, KEBREAB E, WAGHORN G., MAKKAR H. P. S, ADESOGAN A. T, YANG W, LEE C, GERBER P. J, HENDERSON B AND TRICARICO J. M, 2013. Mitigation of methane and nitrous oxide emissions from animal operations: I.A review of enteric methane mitigation options/ J Anim Sci, 91:5045-5069.

HRISTOV, A.N., OH, J., LEE, C., MEINEN, R., MONTES, F., OTT, T., FIRKINS, J., ROTZ, A., DELL, C., ADESOGAN, A., YANG, W., TRICARICO, J., KEBREAB, E., WAGHORN, G., DIJKSTRA, J. & OOSTING, S. 2013. Mitigación de las emisiones de gases de efecto invernadero en la producción ganadera – Una revisión de las opciones técnicas para la reducción de las emisiones de gases diferentes al CO. Editado por Pierre J. Gerber, Benjamin Henderson y Harinder P.S. Makkar. Producción y Sanidad Animal FAO Documento No. 177. FAO, Roma, Italia.

²

IDEAM, 2009. Inventario nacional de fuentes y sumideros de gases de efecto invernadero 2000 – 2004. Bogotá D.C.

IPCC. IPCC GUIDELINES FOR NATIONAL GREENHOUSE GAS INVENTORIES, 2006. Available online: <http://www.ipcc-nggip.iges.or.jp/public/2006gl/vol4.html>.

JANSMAN, A. J. M, 1993. Tannins in feedstuffs for simple-stomached animals. Nutrition Research Reviews 6:209-236.

JOHNSON KA, HUYLEM M, WESTBERG H, BRIAN L, ZIMMERMAN P, 1994. Measurement of methane emissions from ruminant livestock using a SF₆ tracer technique. Environ Sci Technol;28:359–362.

- JOHNSON KA, JOHNSON DE., 1995. Methane emissions from cattle. *J Animal Science*; 73: 2483-2492
- JOUANY, J.P, 1994. Manipulation of microbial activity in the rumen. *Archives of Animal Nutrition* 46, 133-153.
- KAMRA DN, PATRA AK, CHATTERJEE PN, RAVINDRA KUMAR, NEETA AGARWAL, CHAUDHARY LC, 2008. Effect of plant extracts on methanogenesis and microbial profile of the rumen of buffalo: a brief review. *Aust J Exp Agric*;(48):175–178. fatty acid profiles in dairy cattle. *Anim. Feed Sci. Tech*, 166-167, 590-595.
- KAMRA DN, PATRA AK, CHATTERJEE PN, RAVINDRA KUMAR, NEETA
- KELLY JM, KERRIGAN B, MILLIGAN LP, MCBRIDGE WM, 1994. Development of a mobile, open–circuit indirect calorimetry system. *Can J Anim Sci*;74:65–71.
- KINSMAN R, SAUER FD, JACKSON HA, WOLYNETZ, MS, 1995. Methane and carbon dioxide emissions from cows in full lactation monitored over a six-month period. *J Dairy Sci*,; 78(12): 2760-2766.
- KINSMAN R, SAUER FD, JACKSON HA, WOLYNETZ, MS, 1995. Methane and carbon dioxide emissions from cows in full lactation monitored over a six-month period. *J Dairy Sci*; 78 (12): 2760-2766
- KUMAR, R. AND M. SINGH, 1984. Tannins: Their adverse role in ruminant nutrition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 32:447-453.

- KURIHARA M, MAGNER T, MCCRABB H, MCCRABB G, 1999. Methane production and energy partition of cattle in the tropics. *British Journal of Nutrition*, 81: 227-234.
- LASSEY, K.R.; PINARES-PATIÑO, C.S.; MARTIN, R.J.; MOLANO, G.; MCMILLAN, A.M.S, 2011. Enteric methane emission rates determined by the SF tracer technique: Temporal patterns and averaging periods. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 166–167, 183–191
- LASSEY, K.R.; ULYATT, M.J.; MARTIN, R.J.; WALKER, C.F.; SHELTON, I.D, 1997. Methane emissions measured directly from grazing livestock in New Zealand. *Atmos, Environ.*, 31, 2905–2914.
- LESTER, D.; GREENBERG, L.A, 1950. The toxicity of sulfur hexafluoride. *Arch. Ind. Hyg. Occup. Med.*, 2, 348–349.
- MARIN GOMEZ ALEJANDRA, 2013. Estimación del inventario de emisiones de metano entérico de ganado lechero en el departamento de Antioquia, Colombia-UNC.
- MCCAUGHEY, W.P.; WITTENBERG, K.; CORRIGAN, D, 1997. Methane production by steers on pasture. *Can. J. Anim. Sci*, 77, 519–524.
- MCGINN, S.M.; CHUNG, Y.H.; BEAUCHEMIN, K.A.; IWAASA, A.D.; GRAINGER, C, 2009. Use of corn distillers'dried grains to reduce enteric methane loss from beef cattle. *Can. J. Anim. Sci.*, 89, 409–413.
- MCLEAN JA, 1972. On the calculation of heat production from open circuit calorimetric measurements. *Br J Nutr*;27:597–600.

- MCLEAN, J.A.; TOBIN, G, 1987. Animal and Human Calorimetry; Cambridge University Press: Cambridge,UK.
- MCSWEENEY, C. S., B. PALMER, D. M. MCNEILL, AND D. O. KRAUSE, 2001. Microbial interactions with tannins: Nutritional consequences for ruminants. Animal Feed Science and Technology 91:83-93.
- MIERES, J.,OLIVERA, L, MARTINO,D., LA MANNA, A., FERNANDEZ, E., PALERMO, R., AND GREMMINGER, H, 2003. Methane emissions from holstein heifers grazing contrasting pastures in Uruguay.
- MOSS AR, JOUANY JP, NEWBOLD J, 2000. Methane production by ruminants: its contribution to global warming. INRA EDP Sciences. Ann Zootech; 49: 231-253
- MORGAVI, D.P., FORANO, E., MARTIN, C. Y NEWBOLD,C.J. 2010. Microbial ecosystem and methanogenesis in ruminants. Animal 4:1024-1036.
- MUELLER-HARVEY, 2006. Unravelling the conundrum of tannins in animal nutrition and health. Journal of the Science of Food and Agriculture 86:2010-2037.
- MURRAY, R. M., A. M. BRYANT, AND R. A. LENG, 1976. Rates of production of methane in the rumen and large intestine of sheep. British Journal of Nutrition 36:1-14
- OKELLY, J.C.; SPIERS, W.G, 1992. Effect of monensin on methane and heat productions of steers fed lucerne hay either ad-libitum or at the rate of 250 g/hour. Aust. J. Agric. Res., 43, 1789–1793.

PEDREIRA, ODO PRIMAVESI, APARECIDA LIMA MAGDA, FRIGHETTO, DE OLIVEIRA GISELE, TERESINHA BERCHIELLI TELMA, 2002, Emisión ruminal de metano por el ganado lechero en el sudeste de Brasil.

PERNA JR.F, MARINO C.T, PINEDO L.A, CASSIANO E.C.O, MARTINS M, SOLORZANO L.A.R, FRIGHETTO R.T.S, BRNDT A, RODRIGUES P.H.M, 2013. Effect of Feed Additives on Methane Production as Determined by the Tracer Technique SF6 in Bovines, Brazil.

PELLETIER, N., PIROG, R. Y RASMUSSEN, R. 2010 Comparative life cycle enviromenal impacts of three beef production strategies in the Upper Midwestern United States.Agric.Syst.103:380-389.

PINARES–PATIÑO CS, CLARK H, WAGHORN G, HUNT C, MARTIN R, LOVEJOY P, WEST J, 2008. Ruminant methane – Extension of the animal calorimetry facility at Agresearch grasslands. Agresearch Limited.

PINARES–PATIÑO CS, HOLMES CW, LASSEY KR AND ULYATT MJ, 2008. Measurement of methane emission from sheep by the sulphur hexafluoride

PINARES–PATIÑO CS, KOOLAARD J, CLARK H, ROCHETTE Y, JOUANY J–P, MARTIN C, 2007. Effect of SF₆ tracer permeation rate upon the calculated ruminal methane production rates using rumen head space gas composition. GGAAC. New Zeland.

- TONINI M, GRIFFITH D, BRYANT G, PHILLIPS F, ECKARD R, GRAINGER C, MCGINN S, 2007. An open air tracer method for measuring CH₄ emissions from cattle. GGAAC. New Zealand.
- SWAINSON N.M, HASKIN S.O, CLARK H, LOPEZ-VILLALOBOS N, Effect of age on methane emissions of red deer stags from weaning until one year of age grazing perennial ryegrass -based pasture.
- ULYATT MJ, BAKER SK, MCCRABB GJ, LASSEY KR, 1999. Accuracy of SF₆ tracer technology and alternatives for field measurements. Aust J Agric Res 50:1329–1334. tracer technique and by the calorimetric chamber: failure and success. Animal;141–148.
- VAN SOEST PJ, 1994. Nutritional ecology of the ruminant. Second edition. Cornell University Press; 476 p.
- VALENCIA DIANA, GIRALDO LUIS, TORRES ALEXANDRA, MARIN ALEJANDRA, 2016. Effect of including leucaena leucocephala in tropical forages diets megathyrsus maximus and brachiaria humidicola on in vitro methane production, Colombia.
- WAGHORN G, MOLANO G, CAVANAGH A, 2003. An Estimate of Whole Herd Methane Production from Cows at the Lincoln University Dairy Farm in October 2003. A report prepared for Landcare Research, New Zealand.

- WAGHORN, G.C.; ULYATT, M.J.; JOHN, A.; FISHER, M.T, 1987. The effect of condensed tannins on the site of digestion of amino acids and other nutrients in sheep fed on *Lotus corniculatus* L. *British journal of nutrition* 57: 115-126.
- WAINMAN, F.W.; BLAXTER, K.L, 1958. Closed-Circuit Respiration Apparatus for the Cow and Steer. In *Proceedings of the 1st Symposium in Energy Metabolism, Principles, Methods and General Aspects*, Copenhagen, Denmark,; pp. 80–84.
- WEIMER PJ, 1998. Manipulating ruminal fermentation: a microbial ecological perspective. *J Anim Sci*,; 76: 3114 – 3122.
- WESTBERG H, LAMB B, JOHNSON K, HUYLER M, 2001. Inventory of methane emissions from U.S. cattle. *Journal of Geophysical Research*. 106: 12633-12642.
- WIMS, C.M, DEIGHTON, M.H, LEWIS, E, O'LOUGHLIN, B, DELABY, L, BOLAND, T.M & O'DONOVAN, M, 2010. Effect of pregrazing herbage mass on methane production, dry matter intake, and milk production of grazing dairy cows during the mid-season period. *J. Dairy Sci*, 4976-4985.
- WISCHER GERALD, 2012. Effects of monensin and tannin extract supplementation on methane production and other criteria of rumen fermentation in vitro and in long-term studies with sheep, Alemania, Tesis Doctoral.
- WOLIN MJ, 1960. A theoretical rumen fermentation balance. *J Dairy Sci*; (43):1452–1459

- WOODWARD, S.L.; WAGHORN, G.C.; ULYATT, M.J.; LASSEY, K.R., 2001. Early indications that feeding Lotus will reduce methane emissions from ruminants. Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production 61: 23-26.
- ZIMMERMAN, P.R, 1993. System for Measuring Metabolic Gas Emissions from Animals. US.

ANEXOS

Anexo I. Calibración de tubos de permeación en gramos (g)

Fecha \ Tubos	1B40	A1	G17	G18	G19	G27	G3
Inicio	56.127	55,9034	55,7811	55.8289	55,7714	55.8454	55,7658
07/02/2014	58.1922	58,0564	57.8616	57,9533	57,8667	57,772	57,8583
10/02/2014	58,1846	58,0494	57,8549	57,947	57,86	57,7653	57,8505
14/02/2014	58,173	58,0388	57,846	57,9386	57,8512	57,7564	57,8397
18/02/2014	58,1618	58,0285	57,8363	57,9298	57,8419	57,7475	57,8288
28/02/2014	58,154	58,018	57,825	57,92	57,831	57,737	57,815
07/03/2014	58,136	58,006	57,816	57,912	57,823	57,728	57,804
14/03/2014	58,118	57,991	57,8	58,897	57,807	57,712	57,785
21/03/2014	58,101	57,976	57,786	57,884	57,792	57,698	57,769
31/03/2014	58,69	57,944	57,758	57,856	57,764	57,671	57,736
04/04/2014	58,061	57,937	57,75	57,849	57,757	57,663	57,727
11/04/2014	58,041	57,919	57,732	57,832	57,739	57,646	57,707
21/04/2014	58,021	57,9	57,716	57,818	57,723	57,631	57,681
25/04/2014	58,009	57,892	57,706	57,809	57,714	57,621	57,676
02/05/2014	57,994	57,877	57,693	57,796	57,7	57,607	57,601
09/05/2014	57,976	57,861	57,677	57,782	57,685	57,592	57,642
23/05/2014	57,941	57,829	57,646	57,755	57,655	57,563	57,607
31/05/2014	57,918	57,808	57,627	57,737	57,637	57,545	57,585
07/06/2014	57,901	57,794	57,614	57,724	57,624	57,532	57,571
01/07/2014	57,839	57,738	57,559	57,674	57,569	57,48	57,509
09/07/2014	57,819	57,72	57,544	57,659	57,554	57,461	57,487
Tasa perm, mg/day	2,4492	2,1998	2,0763	2,6874	2,0399	2,0142	2,49
R cuadrado	0,3054	0,9971	0,997	0,1632	0,9968	0,9971	0,9788
Intercepto, g	58,2302	58,0603	57,8655	58,0541	57,8706	57,7756	57,8624

Anexo II. Evaluación de tanques

NUMERO DE TANQUE	PRUEBA DE TANQUES			OBSERVACIONES
	09/06/2015	10/06/2015	PERDIDA DE FLUJO	
1	616	594	3.6%	OK
2	608	594	2.3%	OK
3	617	598	3.1%	
4	603	0		OK
5	614	0		DESCARTADO
6	617	598	3.1%	OK
7	616	0		DESCARTADO
8	618	594	3.9%	OK
9	619	502	18.9%	OK
10	615	0		OK
11	615	0		OK
12	616	580	5.8%	OK
13	616	597	3.1%	OK
14	619	597	3.6%	OK
15	600	0		DESCARTADO

Anexo III. Evaluación de capilares

NUMERO DE TANQUE	PRUEBA DE TANQUES			PRUEBA DE CAPILARES								PERDIDA DE FLUJO	OBSERVACIONES		
	09/06/2015	10/06/2015	PERDIDA DE FLUJO	10/06/2015	11/06/2015	PERDIDA DE FLUJO	OBSERVACIONES	11/06/2015	12/06/2015	PERDIDA DE FLUJO	OBSERVACIONES			13/06/2015	13/06/2015
1	616	594	3.6%		497	19.3%	OK								OK
2	608	594	2.3%		495	18.6%	OK								OK
3	617	598	3.1%		392	36.5%	Falla capilar								
4	603	0		607	0			616	0			620	584	5.8%	OK
5	614	0		612	0			615	0			617	360	41.7%	DESCARTADO
6	617	598	3.1%		300	51.4%	Falla capilar	612	376	38.6%	OK				OK
7	616	0		608	0			607	0			600	0		DESCARTADO
8	618	594	3.9%		462	25.2%	OK								OK
9	619	502	18.9%		180	70.9%	Falla capilar y tanque	616	525	14.8%	OK				OK
10	615	0		615	0			616	599	2.8%	OK				OK
11	615	0		611	0			616	598	2.9%	OK				OK
12	616	580	5.8%		330	46.4%	Falla capilar y tanque	617	582	5.7%	OK				OK
13	616	597	3.1%		276	55.2%	Falla capilar	619	391	36.8%	OK				OK
14	619	597	3.6%		60	90.3%	Falla tanque	613	592	3.4%	OK				OK
15	600	0		606	0			604	359	40.6%		602	0		

Anexo IV. Registro de vacas en adiestramiento

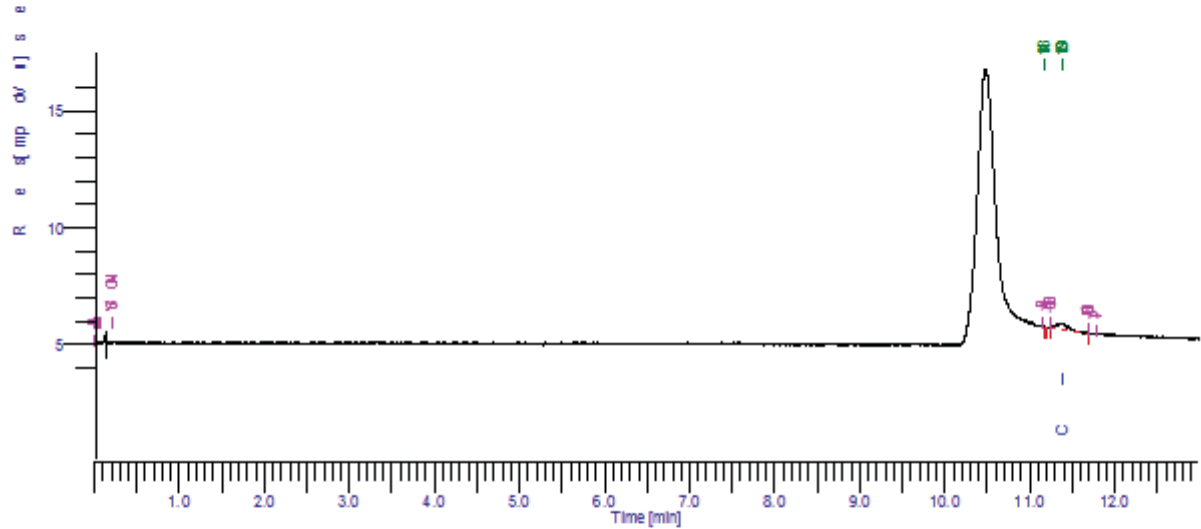
PRIMER LOTE	
Número de arete	Fecha de nacimiento (mes/año)
314	jul-09
324	feb-10
326	feb-10
334	jul-10
346	dic-10
347	ene-11
348	ene-11
352	jul-11
353	jul-11
354	jul-11
362	sep-11
368	dic-11
370	dic-11
SEGUNDO LOTE	
206	may-05
237	may-06
247	sep-06
268	ene-07
277	sep-07
280	sep-07
272	may-07
293	No hay registro
281	sep-07
279	sep-07

Anexo V. Cromatograma de CH₄

Software Version : 6.3.2.0646
Sample Name : V10-02.
Instrument Name : CLARUS 680
Rack/Vial : 0/0
Sample Amount : 1.000000
Cycle : 1

Date : 14/04/2016 10:25:54 a.m.
Data Acquisition Time : 31/08/2015 11:28:32 a.m.
Channel : A
Operator : Manager
Dilution Factor : 1.000000

Result File : C:\GC\DATA\VACUNOS 31-08-2015\V10-02_ch4.rst
Sequence File : C:\GC\DATA\VACUNOS 31-08-2015\VAC.seq



UNSAAC

Peak #	Component Name	Time [min]	Concentration ppm
2	CH4	11.389	7.6548

Missing Component Report

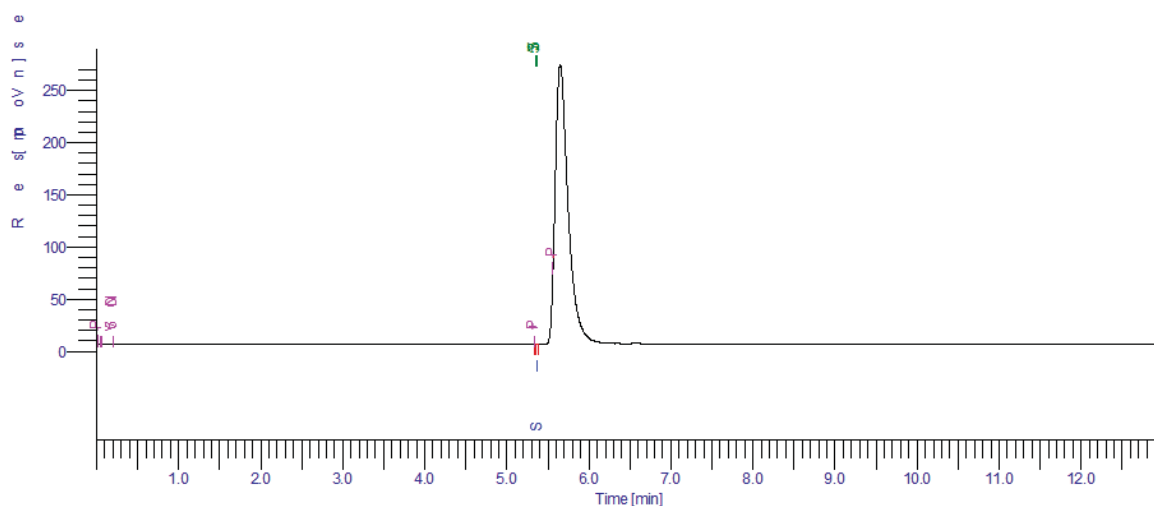
Component	Expected Retention (Calibration)
All components were found	

Anexo VI. Cromatograma de SF₆

Software Version : 6.3.2.0646
 Sample Name : V12
 Instrument Name : CLARUS 680
 Rack/Vial : 0/0
 Sample Amount : 1.000000
 Cycle : 1

Date : 14/04/2016 10:30:32 a.m.
 Data Acquisition Time : 20/09/2015 11:11:31 a.m.
 Channel : B
 Operator : User
 Dilution Factor : 1.000000

Result File : C:\GC\DATA\vacunos nuevo 09-17-2015\V12_sf6.rst
 Sequence File : C:\GC\DATA\vacunos nuevo 09-17-2015\VAC.seq



UNSAAC

Peak #	Component Name	Time [min]	Concentration ppt
2	SF6	5.370	4.8844
			4.8844

Missing Component Report
 Component Expected Retention (Calibration File)

Anexo VII. Modelo de cálculo de metano

Día	Estudio	Animal	Tanque	Factor de dilución	GC SF6, ppt	GC CH4, ppm	GC SF6, media, ppt	GC CH4, media, ppm	Muestra SF6, ppt	Muestra CH4, ppm
15/08/2015	SILAJE HENO	247B	13	1,4321	4,8068	21,9975	4,9434	22,0631	7,0794	31,5968
			13		5,0799	22,1287				
15/08/2015	SILAJE HENO	237	12	3,3741	5,7372	7,939	5,1435	8,1334	17,3548	27,4428
			12		4,5498	8,3277				
15/08/2015	SILAJE HENO	272	1N	2,2535	5,1486	13,0886	5,3575	13,2675	12,0730	29,8983
			1N		5,5663	13,4464				
15/08/2015	SILAJE HENO	277	11	2,4256	5,0547	8,6202	4,8653	9,2372	11,8014	22,4061
			11		4,6758	9,8542				
15/08/2015	SILAJE HENO	206	20	2,2310	5,1207	12,0123	4,9305	11,9995	11,0000	26,7709
			20		4,7403	11,9866				
16/08/2015	SILAJE HENO	247B	5A	1,9274	5,9015	31,4809	5,9015	31,4809	11,3745	60,6759
			5A		5,9015	31,4809				
16/08/2015	SILAJE HENO	237	11A	1,8023	9,29121	45,9076	9,2912	45,9076	16,7456	82,7398
			11A		9,29121	45,9076				
16/08/2015	SILAJE HENO	272	12P	1,4387	5,452	7,3635	5,4520	7,3635	7,8437	10,5937
			12P		5,452	7,3635				
16/08/2015	SILAJE HENO	277	1P	2,9481	4,8545	6,915	4,8545	6,9150	14,3116	20,3861
			1P		4,8545	6,915				
16/08/2015	SILAJE HENO	206	10	1,3992	4,8157	25,2421	4,8157	25,2421	6,7382	35,3190
			10		4,8157	25,2421				
17/08/2015	SILAJE HENO	247B	1N	1,6853	5,1689	23,8949	5,2207	27,1655	8,7986	45,7830
			1N		5,2724	30,436				

Anexo VIII. Análisis de varianza y prueba de Duncan de la producción de metano en gramos por día (CH₄, g/día)

Análisis de la varianza

Variable	N	CV
CH ₄ , g/d	42	52.08

Cuadro de Análisis de la Varianza

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	278315.17	1	278315.17	4.15	0.0483
TRATAMIENTO	278315.17	1	278315.17	4.15	0.0483
Error	2683541.95	40	67088.55		
Total	2961857.12	41			

Test:Duncan Alfa=0.05

Error: 67088.5487 gl: 40

TRATAMIENTO	Medias	n	E.E.
TANINOS	415.91	21	56.52 A
SILAJE HENO	578.71	21	56.52 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Anexo IX. Análisis de varianza y prueba de Duncan de la producción de metano en litros por día (CH₄, l/día)

Análisis de la varianza

Variable	N	CV
CH ₄ , l/d	42	52.08

Cuadro de Análisis de la Varianza

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	647263.48	1	647263.48	4.15	0.0483
TRATAMIENTO	647263.48	1	647263.48	4.15	0.0483
Error	6240877.37	40	156021.93		
Total	6888140.84	41			

Test:Duncan Alfa=0.05

Error: 156021.9341 gl: 40

TRATAMIENTO	Medias	n	E.E.
TANINOS	634.26	21	86.20 A
SILAJE HENO	882.54	21	86.20 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Anexo X. Análisis de varianza y prueba de Duncan de la producción de metano en gramos por kilogramo de peso vivo (CH₄, g/kg PV/día)

Análisis de la varianza

Variable	N	CV
CH ₄ , g/kg PV/d	42	72.39

Cuadro de Análisis de la Varianza

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	15.08	9	1.68	2.23	0.0464
TRATAMIENTO	3.63	1	3.63	4.83	0.0354
DIA	10.56	8	1.32	1.75	0.1238
Error	24.08	32	0.75		
Total	39.15	41			

Test:Duncan Alfa=0.05

Error: 0.7524 gl: 32

TRATAMIENTO Medias n E.E.

TANINOS 0.96 21 0.19 A

SILAJE HENO 1.56 21 0.20 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Anexo XI. Análisis de varianza y prueba de Duncan de la producción de metano entre días

Análisis de la varianza

Variable	N	CV
CH ₄ , g/kg PV/d	21	75.41

Cuadro de Análisis de la Varianza

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	17.09	8	2.14	1.61	0.2196
TRATAMIENTO	0.00	0	0.00	sd	sd
DIA	17.09	8	2.14	1.61	0.2196
Error	15.90	12	1.32		
Total	32.98	20			

Test:Duncan Alfa=0.05

Error: 1.3246 gl: 12

TRATAMIENTO Medias n E.E.

SILAJE HENO 1.58 21 0.27 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Test:Duncan Alfa=0.05

Error: 1.3246 gl: 12

DIA	Medias	n	E.E.	
4	0.60	2	0.81	A
8	0.64	2	0.81	A
2	0.76	4	0.58	A
3	0.97	3	0.66	A
9	1.36	1	1.15	A
1	1.74	2	0.81	A
7	2.42	3	0.66	A
5	2.48	2	0.81	A
6	3.29	2	0.81	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Análisis de la varianza

Variable	N	CV
CH4, g/kg PV/d	21	34.58

Cuadro de Análisis de la Varianza

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0.56	8	0.07	0.77	0.6322
TRATAMIENTO	0.00	0	0.00	sd	sd
DIA	0.56	8	0.07	0.77	0.6322
Error	1.09	12	0.09		
Total	1.65	20			

Test:Duncan Alfa=0.05

Error: 0.0906 gl: 12

TRATAMIENTO	Medias	n	E.E.	
TANINOS	0.86	21	0.07	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Test:Duncan Alfa=0.05

Error: 0.0906 gl: 12

DIA	Medias	n	E.E.	
7	0.44	1	0.30	A
2	0.76	3	0.17	A
9	0.80	2	0.21	A
1	0.80	3	0.17	A
4	0.83	3	0.17	A
3	0.86	3	0.17	A
8	0.95	2	0.21	A
5	1.12	2	0.21	A
6	1.17	2	0.21	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Anexo XII. Análisis de varianza y prueba de Duncan de la producción de metano producido en gramos por kilogramo de peso metabólico (CH₄, g/kg P^{0.75})

Análisis de la varianza

Variable	N	CV
CH ₄ , g/kg PV	0.75 42	57.09

Cuadro de Análisis de la Varianza

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	28.8941	1	28.8941	3.7016	0.0615
TRATAMIENTO	28.8941	1	28.8941	3.7016	0.0615
Error	312.2314	40	7.8058		
Total	341.1256	41			

Test:Duncan Alfa=0.05

Error: 7.8058 gl: 40

TRATAMIENTO	Medias	n	E.E.
TANINOS	4.07	21	0.6097 A
SILAJE HENO	5.72	21	0.6097 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Anexo XIII. Análisis de varianza y prueba de Duncan de la producción de metano producido en gramos por kilogramo de materia seca consumida (CH₄, g/kg MS)

Análisis de la varianza

Variable	N	CV
CH ₄ , g/kg MS	42	0.9877

Cuadro de Análisis de la Varianza

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1530.1616	1	1530.1616	3.5813	0.0657
TRATAMIENTO	1530.1616	1	1530.1616	3.5813	0.0657
Error	17090.5130	40	427.2628		
Total	18620.6746	41			

Test:Duncan Alfa=0.05

Error: 427.2628 gl: 40

TRATAMIENTO	Medias	n	E.E.
TANINOS	29.0059	21	4.5106 A
SILAJE HENO	41.0777	21	4.5106 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)