

UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO HENRÍQUEZ UREÑA

**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y
RECURSOS NATURALES**

ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA

Medición de Emisiones de Metano Entérico en Novillas Bovinas Mestizas de Doble Propósito, en Condiciones de Pastoreo en la República Dominicana.



Trabajo de grado presentado por:

EMMANUEL ENRIQUE MARTÍNEZ CAMBIER

Para la obtención del grado de: Doctor en Medicina Veterinaria.

Asesores:

Dr. Gregorio García Lagombra, *Ph.D.*

Ing. Joaquín Caridad Del Rosario, *M.Sc.*

Ing. Víctor Asencio Cuello, *M.Sc.*

Santo Domingo, D.N., República Dominicana.

Octubre, 2020

DEDICATORIA

A la memoria de mi querida abuela, María Trinidad Marmolejos Álvarez “Mami Mery”, que estuvo siempre acompañándome en este camino, hasta en sus últimos momentos. Gracias por nunca dejar de decirme lo orgullosa que estabas de mí y de todo lo que había logrado, y por tener fe en que podría alcanzar las metas que me propusiera.

A mis padres Emilio Martínez Sánchez y Evangelina Cambier Marmolejos, porque su amor y apoyo incondicional siempre han sido fuerzas que impulsan mi vida. Verdaderamente, no puedo expresar con palabras lo importantes que son para mí. Gracias por todo.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar un profundo agradecimiento a Dios, por ser mi guía y por darme la fortaleza para llevar a cabo esta labor. *Ad maiorem Dei gloriam.*

Agradezco a mis padres y familiares por su constante apoyo en la trayectoria de mi vida. De modo particular, quiero agradecer a mi tío, el Dr. Enrique Cambier Marmolejos, por sus invaluable consejos sobre el buen desarrollo metodológico de una investigación.

A mis asesores y consejeros de trabajo de grado, el Dr. Gregorio García Lagombra, el Ing. Joaquín Caridad Del Rosario y el Ing. Víctor Asencio Cuello. Les agradezco por toda su dedicación y paciencia durante este largo trayecto. Gracias por otorgarme su confianza. Verdaderamente, aprecio en gran medida toda su ayuda.

Un sincero agradecimiento al personal del Centro de Producción Animal (CPA) del Instituto Dominicano de Investigaciones Agropecuarias y Forestales (IDIAF) que participó en la ejecución de las actividades de este proyecto, y que me ofrecieron su colaboración desde el primer día. Agradezco también a los que prestaron su apoyo técnico en esta investigación.

A mis profesores y a todos los que fueron parte de mi aprendizaje, gracias por ayudarme a crecer en conocimientos y a desarrollarme como profesional. También doy las gracias a mis amigos y colegas, por alentarme y por tener siempre fe en mí.

Y finalmente, quiero agradecer a todas las personas que estuvieron de alguna forma involucradas en la realización de este proyecto.

RESUMEN

Se realizó un experimento para instalar la técnica de trazado con hexafluoruro de azufre (SF₆) para la cuantificación de emisiones de metano entérico (CH₄) en novillas en pastoreo. Se condujo en el Centro de Producción Animal del IDIAF, km.24 Autopista Duarte, Pedro Brand, Santo Domingo Oeste, República Dominicana. La ubicación geográfica es 18°54'84" latitud norte y 70°07'65" longitud oeste, altura 90 msnm. Se empleó un diseño experimental completamente al azar, comparando tres dietas: novillas en pastoreo, pastoreo+alimento concentrado, y pastoreo+alimento concentrado+monensina sódica. Se evaluaron las concentraciones de CH₄ entérico, concentraciones ambientales y consumo estimado de materia seca (MSI). Se tomaron 140 sub-muestras gaseosas; fueron analizadas mediante cromatografía de gases. En los grupos de novillas que consumieron solo forraje se obtuvo como resultado un promedio de 112.96 gramos de CH₄/día, 17.99 gramos de CH₄ kg/MSI/día y 0.45 gramos CH₄/PV/día. En los grupos de novillas consumiendo forraje y alimento concentrado, se obtuvieron emisiones de 128.30 gramos CH₄/día, de 15.68 gramos de CH₄/kg de MSI/día y 0.55 gramos de CH₄/PV/día. En el grupo consumiendo forraje+concentrado+monensina, se obtuvieron emisiones de 95.53 gramos de CH₄/día, de 10.11 gramos de CH₄/MSI/día y de 0.34 gramos de CH₄/PV/día. Se concluyó que al adicionarse alimento concentrado a novillas en pastoreo hay un incremento en la emisión de CH₄ entérico (gramos de CH₄/día), aunque el consumo de alimento concentrado no incrementa las emisiones de CH₄ en base a kg/MSI. Al agregar monensina al concentrado se reducen significativamente las emisiones de CH₄ en comparación con las otras dietas evaluadas.

Palabras Claves: CH₄, SF₆, Gases de Efecto Invernadero, Novillas, Pastoreo, Monensina.

ABSTRACT

An experiment was carried out to install the sulphur hexafluoride (SF₆) tracer technique for the quantification of enteric methane (CH₄) emissions in grazing heifers. It was conducted in the Animal Production Center of the Dominican Institute for Agriculture and Forestry Research (*Instituto Dominicano de Investigaciones Agropecuarias y Forestales* [IDIAF]) which is located at the Duarte Highway, km.24, Pedro Brand, Santo Domingo Oeste, Dominican Republic. The geographic location is 18°54'84" north latitude and 70°07'65" west longitude, 90 meters above sea level. A completely randomized experimental design was employed, in which three diets were compared: heifers on grazing pastures, heifers on grazing+concentrate and heifers on grazing+concentrate+sodium monensin. Enteric CH₄ concentrations, atmospheric CH₄ concentrations and estimated dry matter intake (DMI) were evaluated. There were 140 gaseous sub-samples collected, which were analyzed by gas chromatography. In the groups of grazing heifers, average results of 112.96 grams of CH₄/day, 17.99 grams of CH₄/kg/DMI/day & 0.45 grams CH₄/LW/day were obtained. The groups of heifers on grazing+concentrate resulted in an average of 128.30 grams of CH₄/day, 15.68 grams of CH₄/kg/DMI/day and 0.55 grams of CH₄/LW/day. Finally, the group of heifers on grazing+concentrate+monensin resulted in emissions of 95.53 grams CH₄/day, 10.11 grams CH₄/DMI/day and 0.34 grams CH₄/LW/day. It was concluded that by adding concentrate to grazing heifers, enteric CH₄ emission (CH₄/grams/day) increases. However, the addition of concentrate to grazing heifers did not increase CH₄ emission based on kg/DMI. By adding monensin to the concentrate, the CH₄ emissions were significantly reduced compared to the other diets evaluated.

Keywords: CH₄, SF₆, Greenhouse Gases, Heifers, Grazing, Monensin.

TABLA DE CONTENIDO

DEDICATORIA	2
AGRADECIMIENTOS.....	3
RESUMEN	4
ABSTRACT	4
TABLA DE CONTENIDO	5
INTRODUCCIÓN	8
OBJETIVOS DE INVESTIGACIÓN.....	12
A. Objetivo General.....	12
B. Objetivos Específicos.....	12
PRIMERA PARTE: REVISIÓN DE LITERATURA	
CAPÍTULO I: REVISIÓN DE LITERATURA	14
A. Antecedentes.....	14
B. Cambio Climático.....	15
C. Gases de Efecto Invernadero	16
D. Cambio Climático y Ganadería	17
E. Metano Entérico	18
F. Control de la Producción de Metano Entérico	19
G. Microorganismos Metanogénicos.....	21
H. Síntesis del Metano Entérico	23
I. Técnica de Trazado con SF ₆	23
J. Ganado de Doble Propósito.....	26
SEGUNDA PARTE: MATERIALES Y MÉTODOS	
CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS	29
A. Localización y Facilidades Físicas del Estudio	29
B. Diseño Experimental.....	29
C. Parámetros Evaluados	30

D. Selección y Tamaño de la Muestra	31
E. Metodología de la Investigación	31
1. Lista de materiales.....	31
2. Procedimiento de medición de metano entérico.....	37
3. Determinación del consumo de materia seca.....	64
4. Análisis de laboratorio.....	66
5. Análisis estadístico.....	66
TERCERA PARTE: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
CAPÍTULO III: RESULTADOS.....	68
A. Concentraciones de CH ₄ y de SF ₆	68
1. Concentraciones atmosféricas de gases de efecto invernadero.....	68
2. Concentraciones de CH ₄ y SF ₆ detectadas en muestras de gas nitrógeno.....	69
3. Concentraciones de CH ₄ y SF ₆ detectadas en muestras de animales control.....	70
B. Emisiones de Metano.....	71
C. Rendimiento de Emisiones de Metano.....	73
D. Análisis Estadísticos	77
E. Análisis Químico de Alimentos, Forrajes y Heces Bovinas.....	80
CAPÍTULO IV: DISCUSIÓN.....	82
CUARTA PARTE: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES	89
CAPÍTULO VI: RECOMENDACIONES	92
QUINTA PARTE: REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	
CAPÍTULO VII: REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94
A. Lista de Referencias.....	94
SEXTA PARTE: ANEXOS	
CAPÍTULO VIII: ANEXOS	103

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

El metano (CH_4) es considerado como uno de los gases que contribuyen al efecto invernadero ya que absorbe y emite radiación térmica, influyendo de esta forma al fenómeno del calentamiento global y al cambio climático. Se estima que cerca de 500 millones de toneladas métricas de CH_4 ingresan a la atmósfera anualmente debido a actividades humanas y fenómenos naturales (Carmona, Bolívar & Giraldo, 2005; Johnson & Johnson, 1995; Lassey, 2014).

La agricultura y la producción pecuaria contribuyen a las emisiones antropogénicas de CH_4 a la atmósfera, siendo la ganadería una de las actividades que más aportan a las emisiones de este gas (Johnson & Johnson, 1995; Inventario Nacional de Gases de Efecto Invernadero de la República Dominicana [INGEI], 2015). Esto se debe a que los rumiantes, principalmente los bovinos (familia Bovidae), producen una considerable cantidad de CH_4 en los procesos de fermentación anaeróbica que se llevan a cabo en el rumen.

En este compartimiento gástrico existen diferentes especies de microorganismos que transforman la materia vegetal ingerida por el rumiante en sustancias químicamente simples que luego pasan a ser absorbidas por el sistema digestivo del animal. Sin embargo, en estos procesos también se producen moléculas no utilizables por el rumiante como el hidrógeno (H_2) y el dióxido de carbono (CO_2), los cuales deben eliminarse para mantener un balance en el pH del ambiente ruminal (Beauchemin, Kreuzer, O'Mara & McAllister, 2008; Carmona *et al.*, 2005; Galindo, Marrero & González, 2005).

Las arqueas metanogénicas son microorganismos procariotas pertenecientes al dominio Archaea. Estas son capaces de utilizar el H_2 y el CO_2 ruminal para producir CH_4 , el cual es

eliminado del organismo por medio de la eructación y de la exhalación. En los procesos químicos de la metanogénesis hay un considerable gasto de energía que consecuentemente no podrá ser aprovechada por el animal (Beauchemin *et al.*, 2008; Carmona *et al.*, 2005; Ramírez-Bribiesca, 2018).

La producción de CH₄ por rumiantes representa un gasto energético que resulta en una disminución de la productividad. Al reducir las emisiones de CH₄ la energía que normalmente se destinaba a la metanogénesis (de un 2% hasta un 12% de la energía bruta ingerida, dependiendo de la dieta) podrá ser reorientada a la producción de leche o a la ganancia de peso (Johnson, Westberg, Michal & Cossalman, 2007). De esta forma se estarían contemplando beneficios tanto para el animal como para el productor, y al mismo tiempo se reducirán las emisiones de este gas de efecto invernadero (GEI) disminuyendo así la contribución al fenómeno del cambio climático.

Para esto, existen diversos métodos destinados a reducir las emisiones de CH₄, como la utilización de dietas concentradas con mayor digestibilidad, el uso de leguminosas en el forraje, las vacunas antimetanogénicas, la aplicación de extractos vegetales en el alimento y la adición de algunas sustancias a la dieta de los animales. Entre estas sustancias se destacan los antibióticos ionóforos, como la monensina sódica (Beauchemin *et al.*, 2008; Bonilla & Lemus, 2012; Ramírez-Bribiesca, 2018).

Para evaluar los efectos de estos tratamientos en la mitigación de la producción de CH₄, primeramente es necesario cuantificar las emisiones de CH₄ y para esto se ha desarrollado la técnica de trazado con hexafluoruro de azufre (SF₆), la cual es utilizada principalmente en condiciones de pastoreo (Berndt *et al.*, 2014).

Bajo la Convención Marco Sobre el Cambio Climático, en la vigesimoprimera sesión de la Conferencia de las Partes (COP 21, 2015) que se celebró en París, Francia en el año 2015, varios países se han comprometido a cuantificar y reducir las emisiones de GEI, incluyendo el CH₄. Entre estos países está la República Dominicana.

En este país no hay disponible estudios científicos ni datos reales que determinen la emisión de GEI producidos por el sector ganadero a nivel nacional (INGEI-RD, 2015). Asimismo, no existen precedentes en la aplicación de técnicas para coleccionar muestras y medir las emisiones de metano en bovinos, y por esta razón se realizará la presente investigación.

OBJETIVOS DE INVESTIGACIÓN

OBJETIVOS DE INVESTIGACIÓN

A. Objetivo General.

Cuantificar las emisiones de metano (CH₄) entérico mediante la técnica de trazado con hexafluoruro de azufre (SF₆) en novillas mestizas (*Bos taurus* × *Bos indicus*) de doble propósito, en condiciones de pastoreo en la República Dominicana.

B. Objetivos Específicos.

- * Implementar, por primera vez en la República Dominicana, el proceso de colección de CH₄ entérico emitido por novillas mestizas (*Bos taurus* × *Bos indicus*) en condiciones de pastoreo, a través de la técnica de trazado con SF₆.
- * Cuantificar las emisiones de CH₄ entérico producidas por novillas mestizas (*Bos taurus* × *Bos indicus*), comparando la producción en pastoreo exclusivo, y en pastoreo más un alimento concentrado.
- * Utilizar un antibiótico ionóforo (monensina sódica) como alternativa de mitigación de las emisiones de CH₄ entérico producido por novillas mestizas (*Bos taurus* × *Bos indicus*).
- * Estimar el consumo de forraje en condiciones de pastoreo.

PRIMERA PARTE

REVISIÓN DE LITERATURA

CAPÍTULO I: REVISIÓN DE LITERATURA

A. Antecedentes.

Las emisiones de metano (CH₄) están estrechamente relacionadas a la agricultura y a la producción de alimentos, siendo la ganadería y la producción de arroz los sectores que más contribuyen a las emisiones de este gas con efecto invernadero (GEI). Debido al rápido desarrollo de la industria de la agricultura en los últimos siglos, la cantidad de CH₄ en la atmósfera ha aumentado (Lassey, 2014).

Esto ha llamado la atención de algunos países que, debido a su participación en tratados internacionales como el Protocolo de Kioto firmado en el 1998, tienen obligaciones de medir y disminuir las emisiones generales de GEI, y como consecuencia han considerado aplicar medidas de mitigación para las emisiones originadas por la agricultura (Lassey, 2014).

La República Dominicana ha asumido el compromiso, junto a otros países latinoamericanos como Chile, Uruguay, Argentina y Colombia, de periódicamente elaborar reportes nacionales al Panel Intergubernamental de Cambio Climático (*Intergovernmental Panel on Climate Change* [IPCC]) en las que se reportarán las emisiones, absorciones y planes de mitigación de GEI, para evaluar las contribuciones al cambio climático (INGEI-RD, 2015).

En el país se desarrolló el proyecto «Cambio Climático y Ganadería: Cuantificación y Opciones de Mitigación de las Emisiones de Metano y Óxido Nítrico de Origen Bovino en Condiciones de Pastoreo», financiado por el Fondo Regional de Tecnología Agropecuaria

(FONTAGRO). El mismo fundó las bases para conocer las técnicas de medición de gases y se encargó del entrenamiento en los aspectos de cuantificar las emisiones locales de CH₄ y óxido nitroso (N₂O) provenientes de bovinos en condiciones de pastoreo, contando con el apoyo de científicos de Nueva Zelanda a través de la red «*Livestock Emission Abatement Research Network*» (LEARN). La presente investigación se enmarca dentro de las experiencias de este proyecto ya ejecutado (FONTAGRO, 2015).

B. Cambio Climático.

El glosario del Panel Intergubernamental de Cambio Climático (IPCC) establece que el término «Cambio Climático» (CC) hace referencia a una variación del estado del clima identificable en las variaciones del valor medio de sus partes, que persiste durante períodos prolongados. Es principalmente atribuido a actividades humanas, las que directa o indirectamente alteran la composición de la atmósfera terrestre más allá de la variabilidad natural del clima observada durante períodos comparables (IPCC, 2018).

Cabe mencionar que existen factores naturales que también contribuyen a este fenómeno, como son el vulcanismo, el ciclo solar, las variaciones de la órbita del planeta, etc. Sin embargo, numerosos estudios de carácter científico señalan que en las últimas décadas las actividades humanas han aportado en una mayor medida al CC, debido al aumento de la concentración de los gases de efecto invernadero (GEI) en la atmósfera a causa del uso intensivo de combustibles fósiles y de la deforestación para la agricultura. Esto convierte al CC en uno de los mayores desafíos que enfrenta la sociedad en el siglo actual (Francisco, 2015).

Según el Inventario Nacional de Gases de Efecto Invernadero (INGEI, 2015), la República Dominicana contribuye solo con el 0.06% de las 49 giga toneladas de GEI registradas como cifras record en las emisiones históricas desde la revolución industrial. A pesar de esto, este país suele posicionarse entre los más vulnerables a los efectos del CC.

C. Gases de Efecto Invernadero.

Los gases de efecto invernadero (GEI) son aquellos componentes gaseosos de la atmósfera, tanto naturales como antropogénicos que absorben y emiten radiación térmica. Estos tienen moléculas con dos o más átomos que se mantienen unidos con suficiente espacio entre sí como para poder vibrar cuando absorben calor. Eventualmente la molécula que vibra libera radiación y esta será posiblemente absorbida por otra molécula de GEI. Esto permite que el calor quede atrapado en la atmósfera, cerca de la superficie de la tierra, produciendo el calentamiento global por efecto invernadero (Bonilla & Lemus, 2012; IPCC, 2018).

La cantidad de GEI liberados debido a actividades humanas ha incrementado de manera significativa en los últimos años, lo cual está propiciando la amplificación del efecto invernadero natural y el cambio climático global debido a que se sobrepasan los mecanismos naturales de remoción de estos gases (Smith *et al.*, 2014). La agricultura y la producción pecuaria contribuyen considerablemente a las emisiones antropogénicas de metano (CH₄), dióxido de carbono (CO₂) y óxido nitroso (N₂O) a la atmósfera.

Debido a esto se están encaminando esfuerzos a reducir las emisiones y prevenir el calentamiento global para proteger así el sistema climático natural del planeta, considerándose

que los sistemas de producción animal sostenibles deben inclinarse a reducir la producción de CH₄ (Bonilla & Lemus, 2012; Carmona *et al.*, 2005).

Entre los principales gases de efecto invernadero que se encuentran en la atmósfera se pueden mencionar el vapor de agua (H₂O), el dióxido de carbono (CO₂), el óxido nitroso (N₂O), el metano (CH₄) y el ozono (O₃). Por otra parte, hay una serie de GEI que son exclusivamente fabricados por el hombre, como son los hidrofluorocarbonos (HFC), los perfluorocarbonos (PFC) y otros halocarbonos, y el hexafluoruro de azufre (SF₆) (IPCC, 2018).

D. Cambio Climático y Ganadería.

La agricultura y la producción pecuaria contribuyen a las emisiones antropogénicas de metano (CH₄), dióxido de carbono (CO₂) y óxido nitroso (N₂O). El incremento y rápido desarrollo de estas actividades agropecuarias durante los últimos años ha provocado un aumento de la concentración atmosférica de estos gases (Carmona *et al.*, 2005; Smith *et al.*, 2014).

De estos, el CO₂ es el más abundante en la atmósfera y el que actualmente tiene un mayor aporte al calentamiento global. El CH₄, a pesar de encontrarse en menor concentración atmosférica, posee un potencial de calentamiento de 28 a 34 veces más intenso que el CO₂, durante un período de 100 años, según el IPCC (Myhre *et al.*, 2013).

Las estimaciones apuntan que la carga atmosférica total de CH₄ es de 5000 Tg (1Tg=10¹²g), y esta carga es sostenida por un ingreso global anual de 554 ± 56 Tg/año del gas. De este ingreso global, 202 ± 35 Tg/año (~40%) son de origen natural, mientras que el 352 ± 45 Tg/año restante es de origen antropogénico. De esta última fracción, 76-92 Tg/año (~25% de las

fuentes antropogénicas y ~15% del ingreso anual) se atribuyen a la ganadería de rumiantes. Estas proporciones son aún mayores en países de gran actividad agropecuaria, como sucede en la mayoría de países latinoamericanos (Lassey, 2014; Prather, Holmes & Hsu, 2012).

E. Metano Entérico.

El metano (CH₄) es un hidrocarburo que se encuentra en la atmósfera en forma de gas y tiene diversas fuentes de origen, que pueden ser fuentes naturales o antropogénicas (Lassey, 2014). El CH₄ entérico es producto de procesos de fermentación anaerobia que se llevan a cabo en el tracto digestivo de los rumiantes, principalmente en el rumen (Ramírez-Bribiesca, 2018).

En estos procesos intervienen diferentes grupos de microorganismos anaerobios, los cuales metabolizan los carbohidratos de la dieta del rumiante hasta degradarlos en piruvato, el que luego se convierte principalmente en compuestos de ácidos grasos volátiles como el acetato, el propionato y el butirato (que serán absorbidos por el animal como nutrientes), y compuestos alcohólicos. En el proceso de síntesis del butirato y del acetato se producen moléculas de hidrógeno (H₂) e iones de hidrógeno (H⁺), los cuales deben ser removidos para mantener un pH ruminal estable y la eficiencia energética durante los procesos de fermentación anaerobia (Beauchemin *et al.*, 2008; Carmona *et al.*, 2005; Ramírez-Bribiesca, 2018).

Los principales mecanismos que actúan como vías de remoción de hidrógeno son la biohidrogenación de ácidos grasos insaturados, la formación de ácido propiónico y la formación de CH₄. En la producción de esta última molécula intervienen diversas rutas metabólicas que implican un gasto de energía para el animal (pudiendo ser mayor al diez por ciento de la energía

bruta ingerida), ya que el CH₄ no puede ser aprovechado por el rumiante (Galindo *et al.*, 2005; Johnson *et al.*, 2007).

El CH₄ pasa a ser eliminado, en su mayor parte, por medio de la eructación. Una menor fracción es eliminada por medio de la exhalación, debido a que el CH₄ generado en los intestinos es absorbido y pasa al torrente sanguíneo para luego ser transportado hacia los pulmones en donde es eliminado junto al aire exhalado. Se estima que apenas un 1% es eliminado por el ano en forma de flatulencias (Johnson *et al.*, 2007; Ramírez-Bribiesca, 2018).

F. Control de la Producción de Metano Entérico.

La cantidad de metano (CH₄) entérico emitido depende principalmente del volumen de alimento consumido y de la composición de la ración. Es menor en dietas bajas en fibra y en dietas de alta digestibilidad, como los concentrados (Gil, 2005; Beauchemin *et al.*, 2008).

Debido a que el contenido de fibra y la digestibilidad de los forrajes están negativamente correlacionados, podría estimarse que el aumento de la digestibilidad de los alimentos sería una opción de mitigación efectiva de CH₄ para el ganado en pastoreo, ya que es un factor que responde a la manipulación (Galindo *et al.*, 2005). Según la madurez de las pasturas, varios estudios en rumiantes han concluido que solo existe una débil correlación entre la producción de CH₄ y la edad del pasto consumido (Clark, Kelliher, & Pinares-Patiño, 2011).

En cuanto a la edad de los animales, se ha establecido que los rumiantes inmaduros tienden a producir menos emisiones de CH₄ en función de la materia seca ingerida, y estas emisiones van aumentando con la edad (Morrison, McBride, Gordon, Wylie & Yan, 2017;

Swainson, Hoskin, Clark & López-Villalobos, 2007). Morrison *et al.* (2017), según un estudio realizado en Irlanda del Norte con novillas lecheras de raza Holstein bajo condiciones de pastoreo con *Lolium perenne* L., determinaron que el promedio de emisiones de CH₄ en becerras era de 98-106 g/día, en novillas añejas de 155-189 g/día, y en novillas gestantes de 169-172 g/día.

En otro ensayo, realizado por Montenegro-Ballesteros y Barrantes-Guevara (2016) en Costa Rica, con novillas lecheras de raza Jersey consumiendo *Digitaria decumbens* y *Brachiaria brizantha*, se obtuvieron valores de emisión de 141-147 gramos de CH₄ por día (Montenegro-Ballesteros & Barrantes-Guevara, 2016), valores similares a los obtenidos en el estudio anterior. En contraposición, con vacas adultas lactantes de raza Holstein, bajo condiciones de pastoreo en Uruguay, se obtuvo un promedio de emisión de CH₄ de 368 g/día (Dini, 2012).

Cuando en la dieta de los bovinos en pastoreo se incluyen leguminosas forrajeras, se mejoran los parámetros productivos y se reducen las emisiones de CH₄. Esta reducción suele ser atribuida a características intrínsecas de las leguminosas como son la mayor tasa de digestibilidad, el menor contenido de fibra y la presencia de sustancias como taninos condensados, polifenoles y saponinas (Beauchemin *et al.*, 2008; Montenegro & Abarca, 2000; Galindo *et al.*, 2005).

Existe una gran diversidad de productos en el mercado (y de productos que todavía están siendo probados de forma *in vitro*) que potencialmente tienen propiedades de reducción de CH₄. Entre estos se pueden mencionar: extractos vegetales (de ajo (*Allium sativum*), de algas marinas (*Asparagopsis taxiformis*), de especias, y aceites esenciales), enzimas, lípidos, levaduras,

vacunas antimetanogénicas y antimicrobianos (Beauchemin *et al.*, 2008; Kinley *et al.* 2016; McAllister & Newbold, 2008; Ramírez-Bribiesca, 2018).

Entre los antimicrobianos más comúnmente utilizados para la inhibición de la metanogénesis están los ionóforos, como la monensina sódica. Estos compuestos incrementan la síntesis de propionato, reduciendo las proporciones de los otros ácidos grasos volátiles, acetato y butirato. Debido a esto, disminuye la producción de hidrógeno y en consecuencia, se reduce la formación de CH₄. De todos modos, este efecto es dependiente de la dosis del medicamento, que debe ser administrado continuamente ya que los efectos inhibitorios no suelen ser persistentes (Beauchemin *et al.*, 2008; Galindo *et al.*, 2005; Patra, Park, Kim & Yu, 2017).

También, entre los mecanismos de acción antimetanogénica de los ionóforos se puede considerar el efecto de defaunación que estos ejercen sobre los protozoarios ruminales (Beauchemin *et al.*, 2008), ya que esto afecta directamente a los microorganismos metanogénicos con los que suelen encontrarse en estrechas relaciones simbióticas (McAllister & Newbold, 2008; Patra *et al.*, 2017).

G. Microorganismos Metanogénicos.

El metano (CH₄) es producido en el rumen por microorganismos unicelulares procariotas pertenecientes al dominio Archaea. Este grupo taxonómico comparte similitudes morfológicas con el dominio Bacteria (con el que se clasificaban conjuntamente dentro del ahora obsoleto reino Monera), pero estudios genéticos y hallazgos bioquímicos han establecido considerables diferencias entre ambos grupos (Jarrell, Bayley, Correia & Thomas, 1999; Woese, Kandler & Wheelis, 1990).

Bajo este dominio se encuentra el filo Euryarchaeota, el cual comprende al grupo de los metanógenos (Jarrell *et al.*, 1999). Este diverso grupo se clasifica en cinco órdenes: Methanobacteriales, Methanococcales, Methanomicrobiales, Methanosarcinales y Methanopyrales. El orden de las Methanobacteriales se divide en dos familias, Methanobacteriaceae y Methanothermaceae (Ramírez-Bribiesca, 2018).

Debido a que estos organismos anaerobios estrictos necesitan condiciones muy específicas para su crecimiento (como un flujo de nutrientes relativamente rápido, la abundancia de hidrógeno (H₂) y dióxido de carbono (CO₂), y una completa ausencia de oxígeno (O₂)), solo se han aislado cultivos puros de 13 especies del rumen: *Methanobacterium formicicum*, *Methanobacterium bryantii*, *Methanobrevibacter ruminantium*, *Methanobrevibacter olleyae*, *Methanobrevibacter millerae*, *Methanomicrobium mobile*, *Methanosarcina barkeri*, *Methanoculleus olentangyi*; y las más recientemente aisladas *Methanobrevibacter boviskoreani*, *Methanobacterium beijingense*, *Methanoculleus marisnigri*, *Methanoculleus bourgensis* y *Methanosarcina mazei* (Janssen & Kirs, 2008; Patra *et al.*, 2017).

Gracias a los avances en el campo de la genómica se ha podido identificar un sinnúmero de nuevas especies de arqueas metanogénicas, entre las cuales se pueden mencionar: *Methanobrevibacter gottschalkii*, *Methanobrevibacter thaueri*, *Methanobrevibacter smithii* y *Methanosphaera stadtmanae* (Patra *et al.*, 2017).

Las arqueas suelen encontrarse en una relación mutualista con otros microorganismos ruminales, ya que para obtener energía y crecer necesitan sustratos químicamente simples (como formiato (HCOO⁻), CO₂ e H₂), los cuales son producidos por microorganismos ruminales como protozoarios, bacterias y hongos (Galindo *et al.*, 2005; Patra *et al.*, 2017).

H. Síntesis del Metano Entérico.

La combinación de hidrógeno (H_2) con el dióxido de carbono (CO_2) es la vía metabólica más común para la metanogénesis. El CO_2 se reduce sucesivamente a metano (CH_4) por acción del H_2 como donador primario de electrones a través de formilo, metilo, metileno y metilo-intermedio. La reducción del resto de carbono implica diversos pasos catalizados por cofactores y enzimas exclusivas de las arqueas metanogénicas, como el formilmetanofurano y las tetrahidrometanopterinas (Galindo *et al.*, 2005; Ramírez-Bribiesca, 2018).

Según el sustrato utilizado como fuente de electrones para la metanogénesis, los metanógenos se pueden clasificar en hidrogenotrofos, metilótrofos y acetotrofos (Ramírez-Bribiesca, 2018).

Los metanógenos hidrogenotrofos pueden crecer utilizando H_2 , el mismo puede ser utilizado como su fuente de energía y utilizar los electrones derivados del H_2 para reducir el CO_2 a CH_4 . Las especies metilótrofas pueden crecer con grupos metilo ($-CH_3$ del metanol, metilaminas o sulfuros de metilo), oxidando parcialmente el CO_2 para generar electrones que se utilizan para reducir aún más los grupos metilo en CH_4 . Los acetotrofos son metanógenos anaerobios facultativos que pueden utilizar el grupo metilo del acetato para producir CO_2 y CH_4 . (Galindo *et al.*, 2005; Ramírez-Bribiesca, 2018).

I. Técnica de Trazado con SF_6 .

El metano (CH_4) producido por los rumiantes se puede estimar mediante cálculos, utilizando ecuaciones que usan los factores de emisión de CH_4 por defecto indicados en las

directrices del IPCC. Este es un enfoque simplificado que no toma en cuenta las características propias de cada país, y debido a que estos factores no han sido corroborados en las condiciones de los sistemas de producción nacional, los resultados pueden ser poco precisos (Dini, 2012; INGEI, 2015).

Para una mayor precisión es necesario medir las emisiones directamente, utilizando técnicas de medición con láser, cámaras cerradas de respiración, o con la técnica de trazado con hexafluoruro de azufre (SF_6) (Carmona *et al.*, 2005; Lassey, 2014). Esta última fue originalmente desarrollada por Johnson y Johnson (1995).

Esta técnica permite la cuantificación diaria de CH_4 por animal y es internacionalmente reconocida como la más apropiada para medir las emisiones de metano en sistemas de pastoreo debido a que los equipos se instalan sobre el animal sin impedir ni limitar sus movimientos ni sus hábitos en la pastura (Johnson *et al.*, 2007; Grainger *et al.*, 2007).

Por varias décadas se han utilizado las técnicas con cámaras cerradas de respiración para estudiar el metabolismo de los rumiantes ya que estas permiten determinar las emisiones de CH_4 con alta precisión. Sin embargo, este método requiere que los animales estén acostumbrados a las condiciones de confinamiento, lo que no permite que muestren un comportamiento natural de pastoreo. Por el contrario, como se ha mencionado anteriormente, la técnica de trazado con SF_6 no afecta los hábitos de pastura de los animales y por eso puede tomar en cuenta factores (como la variabilidad de ingesta por animal) que se presentan en situaciones naturales (Lassey, 2014).

Se han hecho comparaciones entre ambas técnicas para verificar si hay diferencias entre los valores obtenidos en cámaras de respiración y los obtenidos en pastoreo utilizando la técnica de SF_6 (Pinares-Patiño *et al.*, 2011; Grainger *et al.*, 2007; Johnson & Johnson 1995). En estas

investigaciones no se encontraron diferencias significativas entre los valores promedio de emisión de CH₄ obtenidos por ambas técnicas (Berndt *et al*, 2014; Dini, 2012).

Como ejemplo, Grainger *et al.* (2007) reportaron que, en vacas lecheras adultas, las emisiones de CH₄ obtenidas utilizando la técnica de SF₆ (331g de CH₄/día/vaca) fueron similares a las obtenidas en las cámaras de respiración (322g de CH₄/día/vaca), aunque la técnica de SF₆ presentó más variabilidad entre muestras de un mismo animal tomadas en diferentes días. Igualmente, esta presentó más variabilidad entre muestras de diferentes animales (Grainger *et al.*, 2007; Dini, 2012).

La utilización del SF₆ responde a que es un gas considerado como el mejor trazador para medir la cantidad de metano emitido por los rumiantes, debido a que posee una elevada estabilidad en el rumen de los animales, inclusive superior a la de gases isótopos del metano (Ciganda, 2015). Además, es un gas química y biológicamente inerte, con una concentración en la atmósfera muy baja y su dispersión en el rumen es similar a la del CH₄. Estas cualidades lo convierten en el trazador por elección del gas CH₄ (Hegarty & Lassey, 2014).

Para esta técnica un tubo de permeación de latón se carga criogénicamente a -196°C con SF₆ y su tasa de liberación es calculada por varias semanas mediante pesajes continuos, mientras son incubados a 39°C. Estos tubos se insertan en el rumen de cada animal participante antes de iniciar el experimento. Un recipiente pre-evacuado al vacío, que es transportado por los animales en pastoreo, extrae el aire próximo a las cavidades nasales y boca a un ritmo constante. Una muestra de aire exhalado y aire eructado se acumula durante 24 horas (la duración típica de un ciclo de alimentación), y la colecta de estas muestras suele repetirse diariamente por cinco a ocho días, cambiando los recipientes en el proceso. Durante el período de muestreo, se deben colocar

recipientes colectores en el medio de pastoreo, para obtener muestras ambientales representativas de las concentraciones de CH₄ y SF₆ en el aire que respiran los animales. Una sub-muestra de gas de cada recipiente se analiza para las concentraciones de CH₄ y SF₆, generalmente usando cromatografía de gases. Se miden las proporciones de estos gases, tomando en cuenta las concentraciones de estos en el ambiente y la tasa de liberación de SF₆ previamente calculada, para obtener una estimación de la tasa de emisión de CH₄ en el período de colección para cada animal en particular (Berndt *et al.*, 2014; Gere & Gratton, 2010; Hegarty & Lassey, 2014).

Gere y Gratton (2010) publicaron una adaptación de esta técnica que permite diseñar experimentos con animales en pastoreo en tiempos prolongados de muestreo, de 1, 5, 10 días o más (Ciganda, 2015; Gere & Gratton, 2010; Hegarty & Lassey, 2014). Pinares-Patiño *et al.* (2012) realizaron experimentos en donde se redujo la frecuencia de colecta para obtener muestras acumuladas por varios días, lo que puede ser más apropiado en casos en donde los animales se manejan con menos frecuencia (Pinares-Patiño *et al.*, 2012), como en la ganadería de carne y en la ganadería de doble propósito.

J. Ganado de Doble Propósito.

En República Dominicana los sistemas de producción de ganado bovino suelen clasificarse, según el producto final resultante del sistema, en tres categorías: ganadería de carne, ganadería de leche y ganadería de doble propósito (Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura [IICA], 2005).

El sistema de producción mayoritario en el país es el de doble propósito, y debido a esto será el sistema evaluado en la presente investigación. Según los datos obtenidos por la Secretaría

de Estado de Agricultura de República Dominicana (SEA, 1998) en el Censo Nacional de Productores Agropecuarios del año 1998, el 58.3% del hato se destinaba a este sistema de producción, mientras que el 25.8% se destinaba a la producción de carne y el restante 15.9% del hato a la producción de leche (IICA, 2005).

La ganadería bovina de doble propósito es comúnmente practicada en Latinoamérica. Tiene como objetivo la producción de carne y leche simultáneamente, aunque puede enfocarse en uno de estos dos productos. Se usan como base cruces de razas bovinas europeas de producción lechera (*Bos taurus*) con razas criollas o cebuinas (*Bos indicus*) de buena conformación cárnica. Suelen manejarse en sistemas de explotación extensivos, donde la alimentación se basa casi exclusivamente en pastos, sal, minerales, y agua (Gil, 2005; IICA, 2005).

SEGUNDA PARTE

MATERIALES Y MÉTODOS

CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS

A. Localización y Facilidades Físicas del Estudio.

La investigación se realizó en la Estación Experimental Pedro Brand del Centro de Producción Animal, perteneciente al Instituto Dominicano de Investigaciones Agropecuarias y Forestales (IDIAF). Esta estación está ubicada próxima al km. 24 de la Autopista Duarte, en la Avenida Circunvalación Prof. Juan Bosch, Pedro Brand, Santo Domingo Oeste, República Dominicana. La Estación se inserta geográficamente en los 18°54'84" latitud norte y 70°07'65" longitud oeste, a una altura de 90 metros sobre el nivel del mar. La temperatura media anual es de 25 °C. La precipitación promedio anual es de 1800 mm.

B. Diseño Experimental.

El experimento se llevó a cabo en tres fases, durante tres semanas distintas, en razón de que había que coleccionar las informaciones de los tubos colectores cada semana, para evitar el llenado de estos. En las dos primeras (Fase I y Fase II), se administró un suplemento alimenticio concentrado a base de fórmula. En la última fase (Fase III), se administró el mismo suplemento alimenticio con un ionóforo (monensina sódica) añadido.

En la Fase I, se empleó un diseño experimental completamente al azar con dos tratamientos dietéticos y siete unidades experimentales por tratamiento. Una unidad experimental equivale a una novilla. El modelo indica 7x2, equivalente a 7 novillas por dieta x 2 dietas de

pastoreo, para un total de 14 observaciones durante un período de muestreo de cuatro días. Una de las dietas consistió en pastoreo con especies gramíneas y la otra consistió en pastoreo con especies gramíneas más un alimento concentrado.

En la Fase II, se empleó el mismo diseño que en la fase anterior, pero evaluando solo cinco unidades experimentales (novillas) por tratamiento. El modelo indica 5x2, equivalente a 5 novillas por dieta x 2 dietas de pastoreo, para un total de 10 observaciones durante un período de muestreo de cuatro días. Los tratamientos dietéticos fueron los mismos que en la Fase I.

En la fase III, se empleó el modelo de la Fase II (5x2: 5 novillas por dieta x 2 dietas, para un total de 10 observaciones durante un período de muestreo de cuatro días), evaluando las mismas dietas, pero a la dieta con alimento concentrado se le añadió monensina sódica, un antimicrobiano ionóforo.

C. Parámetros Evaluados.

Las variables evaluadas en esta investigación fueron:

- Cantidad de metano entérico emitido por los animales.
- Cantidad de hexafluoruro de azufre emitido por los animales.
- Concentraciones ambientales de metano y de hexafluoruro de azufre.
- Consumo estimado de forraje en condiciones de pastoreo.

D. Selección y Tamaño de la Muestra.

Catorce novillas mestizas (*Bos taurus* × *Bos indicus*) no gestantes, con peso variado (entre 150 y 379 kg), fueron seleccionadas de acuerdo a su peso y asignadas a los tratamientos a través del método reversado, de modo que en cada uno de los grupos los pesos sean homogéneos.

E. Metodología de la Investigación.

Este experimento siguió las normas metodológicas establecidas por el «*Protocolo para Determinación de Emisión de Metano en Rumiantes*», diseñado por el Grupo de Medición de GEI en el Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA) en La Estanzuela, Uruguay (Ciganda, 2015).

1. Lista de materiales.

- Manguera de caño plástico corrugado.
- Arnese con uniones de velcro y hebilla para ajuste según tamaño de cada animal, de colores rojo y azul.
- Porta-tubos con fondo de tela reforzada y broches para acoplarse al arnés.
- Recipientes colectores: cilindros metálicos (500 ml) de acero inoxidable con base y tapa, con rosca ¼” en tapa para conectar acople hembra.

- Acoples rápidos *Swagelok*:
 - 1) Acople hembra, código B-QC4-B-4PM.
 - 2) Espiga macho, código B-QC4-S-4PM.
- Cinta teflón para las uniones de hembra con el recipiente colector.
- Restrictores/reguladores de flujo de aire compuestos por:
 - 1) Conector recto bronce de tubo de 1/4'' de diámetro externo a rosca hembra 1/8'' NPT.
 - 2) Tubo capilar de cobre.
 - 3) Pieza tapón de cabeza hexagonal de rosca 1/8'' NPT.
 - 4) Anillas de compresión de cobre, 1/8''.
 - 5) Insertos de cobre para manguera 1/8''.
 - 6) Manguera de PVC TPU 6*1 10 bar, de 1/4 pulgada.
 - 7) Espiga macho *Swagelok*, código B-QC4-S-4PM.
- Pinza de presión tipo *Vise-Grips*.
- Alicates y llaves hexagonales.
- Soporte de cuero con ajuste al arnés con remaches.
- Trozos de 10 cm de caño plástico transparente para protección de restrictores.

- Tela impermeable al agua pero permeable al aire para protección del punto de muestreo del restrictor.
- Tela plástica impermeable al agua pero permeable al aire para protección del restrictor y cierre del caño protector.
- Manguera de PVC TPU 6*1 10 bar, de 1/4 pulgada que conecta acople macho del recipiente colector de metano con restrictor de entrada de aire.
- Tubos de permeación (o cápsulas) rellenos de SF₆.
- Baño María ajustable a 39 °C.
- Agua destilada.
- Termómetro de mercurio calibrado.
- Lanza-bolos manual.
- Cintas *tie-wrap* plásticas descartables.
- Guantes descartables sin polvo.
- Cinta papel para protección de restrictores.
- Cinta aisladora para ajustar tela a los caños plásticos.
- Tijeras metálicas.
- Tubos de centrifuga tipo *Eppendorf* 50 ml con tapa rosca.

- Retículo de vacío construido con:
 - 1) caños de cobre sin costura ¼ pulgada*0,8 mm;
 - 2) Válvula esférica 1 pieza (llaves de paso) 1/4" latón, *Swagelok* código B-42S4;
 - 3) Unión en cruz Latón ¼ *Swagelok* código B-400-4;
 - 4) Uniones Tee Latón ¼" *Swagelok* código B-400-3;
 - 5) Espigas/conectores con retención 1/4" (m) *Swagelok* código B-QC4-D-400;
 - 6) Manguera de PVC TPU 6*1 10 bar, de 1/4 pulgada.

- Bomba de alto vacío, marca *Savant* modelo VP-190.

- Soporte de madera para instalar piezas del retículo de vacío.

- Vacuómetro digital, modelo *BluVac Professional* de *AccuTools*®.

- Manómetro digital de presión diferencial, marca *Fisherbrand*™ *Traceable*™.

- Tanque de gas nitrógeno (N₂) de alta pureza con regulador de presión con conexión al retículo de vacío.

- Resina epoxi.

- Viales para gas de modelo y tamaño que correspondan al cromatógrafo de gases a utilizar (Recomendación: Viales *PerkinElmer* 22 ml).

- Jeringa plástica 60 ml con aguja.

- Mariposa de tres vías para conectar a jeringa y a la aguja.
- Gafas de seguridad.
- Cuaderno de apuntes.
- Balanza de alta precisión (0.1mg) modelo: *Practum 124-1S Sartorius*.
- Pinzas de acero inoxidable.
- Lápiz y papel.
- Kit de instalación de cerco eléctrico.
- Panel solar generador de electricidad.
- Alambre metálico conductor de electricidad.
- Pinzas corta-alambres.
- Cinta métrica para medición de terrenos, 50 m.
- Estacas de madera.
- Voltímetro.
- Báscula digital para pesar ganado.
- Bolsas plásticas llenas de arena, con un peso de 1.2lb.
- Suplemento alimenticio concentrado preparado a base de fórmula.
- Sacos/bolsas para almacenar alimento.

- Navajas.
- Cinta adhesiva *duct tape*.
- Cajas para transporte de equipos.
- Septos para viales.
- Tapas de aluminio para sello de viales.
- Herramienta crimpadora de tapas de viales.
- Cinta adhesiva *masking tape*.
- Marcador permanente.
- Caja de cartón para transporte de viales.
- Papel plástico de burbujas.
- Pistola de silicona caliente.
- Tirillas de silicona.
- Machete/tijeras para corte de hierba.
- Bolsas plásticas.
- Balanza de reloj colgante.
- Marco hecho con varillas metálicas, de $1/2\text{m}^2$ de área.

2. Procedimiento de medición de metano entérico.

a. Preparación de tubos de permeación de SF₆.

Los tubos de permeación de SF₆, basados en el modelo «*Cattle NIWA Tubes*» desarrollado en Nueva Zelanda (Berndt *et al.*, 2014), fueron adquiridos a través del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) en Argentina. Los tubos fueron previamente calibrados en condiciones controladas para conocer la tasa de liberación de SF₆ de cada uno. Fueron enviados a República Dominicana por vía aérea, donde se almacenaron a temperatura ambiente dentro de tubos de centrífuga plásticos tipo *Eppendorf* de 50 ml, tapa rosca.

Antes de iniciar el experimento, cada tubo de permeación fue pesado en una balanza de alta precisión (0.1mg) para conocer su peso. Luego, para imitar las condiciones de calibración en el laboratorio, se colocaron dentro de un baño María ajustado a 39°C, por un total de cuatro días (96 horas) tomando la precaución de que no se mojaran los tubos.

Después de mantenerse en este entorno, se volvieron a pesar a las 48 horas y finalmente a las 96 horas, momento en el cual se retiran del baño María y son almacenados a temperatura ambiente dentro de los tubos tipo *Eppendorf*. Esto se hizo para confirmar que los tubos no hubiesen perdido su carga útil de SF₆, en cuyo caso los tubos no presentarían una variación de peso al ser sometidos a una temperatura constante de 39°C.

Para el pesaje, se utilizaron guantes desechables sin polvo, y pinzas de acero inoxidable para manipular los tubos y colocarlos sobre la balanza de alta

precisión. Esta balanza se encontraba en un cuarto de pesaje especializado, en donde las corrientes de aire y las vibraciones están reducidas al mínimo (Figura 1).



Figura 1, Entorno de Pesaje de los Tubos de Permeación de SF_6 (Fuente: elaboración propia).

Materiales:

- Tubos de permeación (o cápsulas) rellenos de SF_6 .
- Guantes descartables sin polvo.
- Tubos de centrifuga tipo *Eppendorf* de 50 ml con tapa rosca.
- Balanza de alta precisión (0.1mg) modelo: *Practum 124-1S Sartorius*.
- Pinzas de acero inoxidable.
- Lápiz y papel.
- Baño María ajustable a $39^{\circ}C$.

- Agua destilada.
- Termómetro de mercurio calibrado.

b. Preparación de recipientes colectores de metano.

Se fabricaron cilindros metálicos de acero inoxidable con un volumen interno de aproximadamente 500 ml, con base y tapa con rosca $\frac{1}{4}$ ". En esta rosca, se insertaron los acoples hembra *Swagelok*, sellados con varias vueltas de cinta de teflón para evitar potenciales pérdidas de gas a través de esta unión.

Se realizó el vacío en cada recipiente colector conectándolos al retículo de vacío (Figura 2) y encendiendo la bomba de vacío hasta que el vacuómetro indicara 1.0-0.0 mbar de presión, y el manómetro digital indicara un valor de vacío de aproximadamente 1015-1041 mbar (el valor máximo de vacío registrado por el manómetro digital varía según la temperatura ambiental). Cada recipiente fue numerado para facilitar el monitoreo de su presión.

Para verificar la estanqueidad (conservación del vacío efectuado) de los recipientes colectores, los recipientes evacuados se conectaron al retículo cinco días después del vaciado, para medir su vacío residual con el manómetro. En los recipientes seleccionados, la diferencia de vacío con respecto a la última medición no superó los 50 mbar, lo que indica que mantuvieron un nivel de estanqueidad.

Los que no mantuvieron estanqueidad fueron reparados, sellando los posibles puntos de escape con resina epoxi y volviendo a repetir el procedimiento de

monitoreo de la estanqueidad. Los recipientes defectuosos que no pudieron ser reparados fueron utilizados en el período de adaptación de los animales.

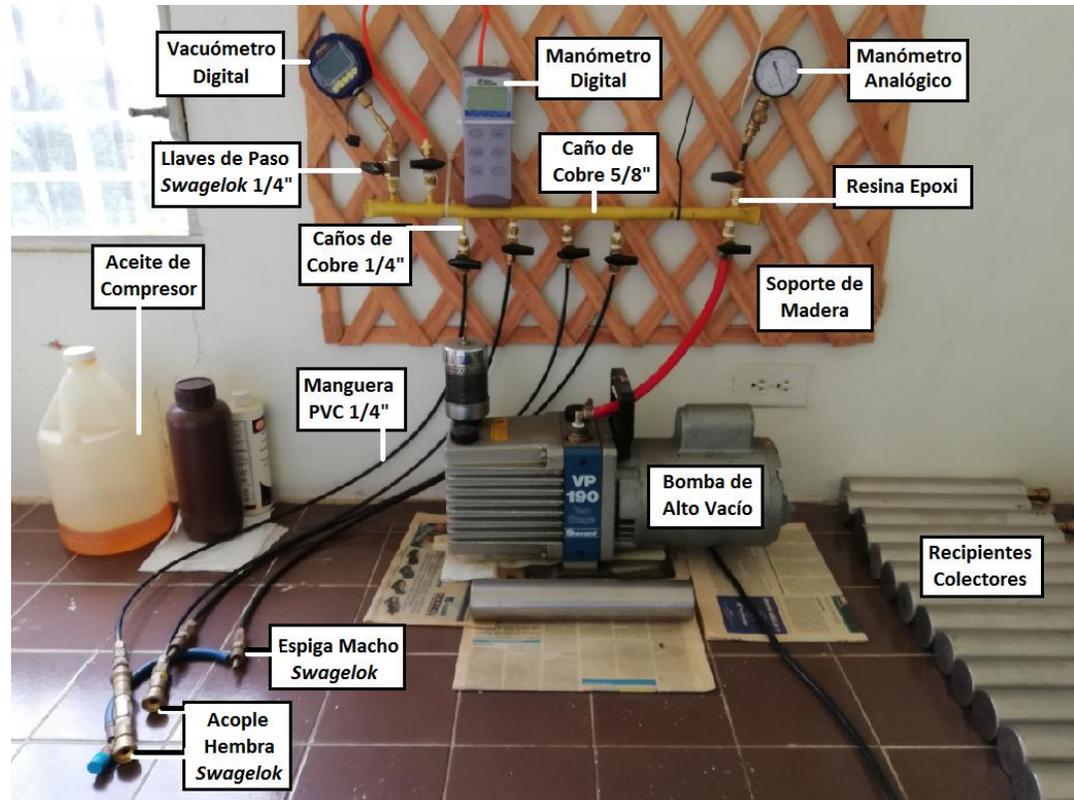


Figura 2, Sistema/Retículo de Vacío Completo (Fuente: elaboración propia).

Materiales:

- Recipientes colectores de metano: cilindros metálicos (500 ml) de acero inoxidable con base y tapa, con rosca $\frac{1}{4}$ " en tapa para conectar acople hembra.
- Acoples rápidos *Swagelok*: 1. Hembra en recipiente colector, código B-QC4-B-4PM.
- Espiga macho *Swagelok*, código B-QC4-S-4PM.
- Cinta teflón.
- Pinza de presión tipo *Vise-Grips*.

- Alicates y llaves hexagonales.
- Manguera de PVC TPU 6*1 10 bar, de 1/4 pulgada que conecta acople macho del recipiente colector de metano con restrictor de entrada de aire.
- Retículo de vacío construido con:
 - 1) caños de cobre sin costura 1/4 pulgada*0,8 mm;
 - 2) Válvula esférica 1 pieza (llaves de paso) 1/4" latón, *Swagelok* código B-42S4;
 - 3) Unión en cruz Latón 1/4 *Swagelok* código B-400-4;
 - 4) Uniones Tee Latón 1/4" *Swagelok* código B-400-3;
 - 5) Espigas/conectores con retención 1/4" (m) *Swagelok* código B-QC4-D-400;
 - 6) Manguera de PVC TPU 6*1 10 bar, de 1/4 pulgada.
- Bomba de alto vacío, marca *Savant* modelo VP-190.
- Soporte de madera para instalar piezas del retículo de vacío.
- Cintas *tie-wrap* plásticas descartables.
- Vacuómetro digital, modelo *BluVac Professional* de *AccuTools*®.
- Manómetro digital de presión diferencial, marca *Fisherbrand*™ *Traceable*™.
- Tanque de gas nitrógeno (N₂) de alta pureza con regulador de presión con conexión al retículo de vacío.
- Resina epoxi.

c. Preparación y ajuste de restrictores de flujo.

Se prepararon nuevos restrictores de flujo basados en el modelo de «tubos capilares comprimidos» («*crimped capillary tubes*») descrito en el manual presentado por Berndt *et al.* (2014). Cada restrictor estuvo compuesto por un tubo capilar de cobre conectado con resina epoxi a un extremo de la manguera PVC de la línea de flujo de gas (Figura 3). La conductancia se reguló al comprimir cuidadosamente un lado del capilar de cobre con una pinza de presión, hasta que quede ligeramente aplanado (Figura 4).

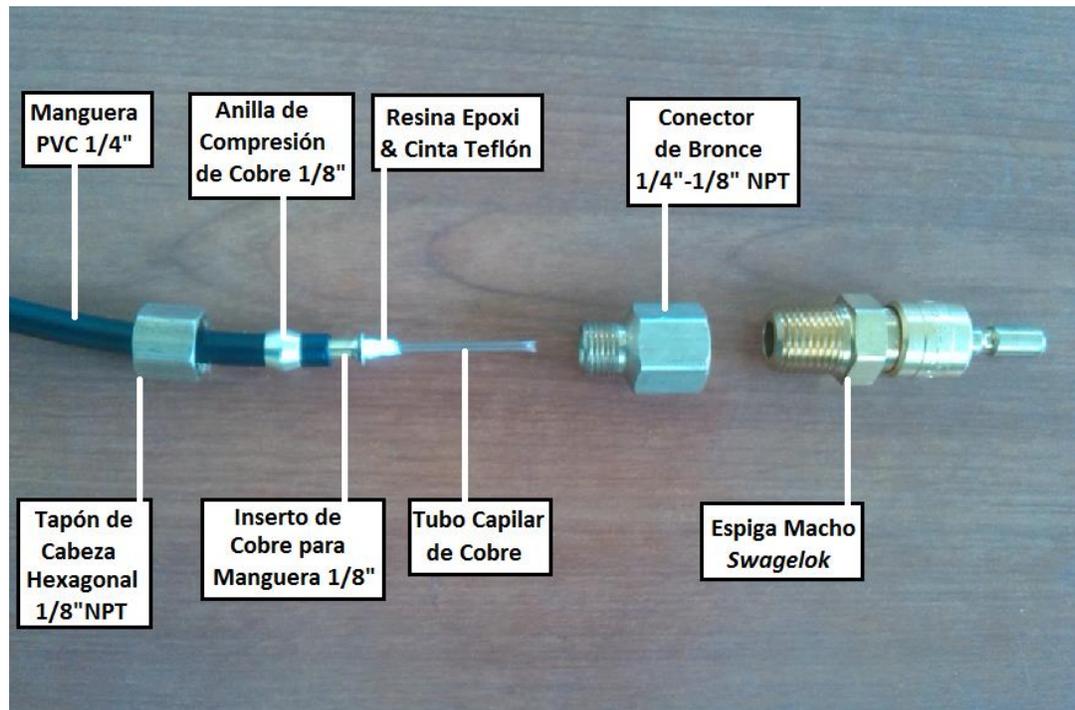


Figura 3, Detalles de la Configuración de los Restrictores de Flujo (Fuente: elaboración propia).

Los restrictores fueron colocados en la unión de las mangueras con los recipientes colectores (dentro del acople conector macho), apartados del punto de muestreo al extremo distal de la línea de flujo. Esta configuración permite reducir las

posibilidades de que se produzcan bloqueos en los restrictores y los escapes a través de perforaciones en las mangueras (Berndt *et al.*, 2014, p. 61).

La velocidad de flujo fue regulada durante un período prolongado, evaluando la cantidad de vacío residual en los recipientes colectores luego de cinco días siguiendo el siguiente proceso:

- Realizar el vacío en cada recipiente colector, conectándolo al retículo. Registrar el valor indicado por el manómetro como «Presión 1».

- Desconectar recipiente del retículo.

- Conectar el restrictor de flujo previamente numerado al recipiente colector.

- Luego de cinco días, desconectar el restrictor, conectar el recipiente al retículo, abrir la llave de paso al manómetro y medir el vacío residual en el recipiente. Registrar como «Presión 2».

- El valor de vacío («Presión 2») debe ser de 500 ± 150 mbar. Un valor menor a este indica que el restrictor está muy abierto, por lo que es necesario comprimir levemente el punto de entrada de gas, para cerrarla. Un valor mayor al esperado indica que el restrictor está muy cerrado. Para abrir la entrada de gas, comprimir cuidadosamente el punto de entrada por el otro lado, girando 90 grados respecto a la posición de compresión inicial, de esta forma abriendo la entrada.

- Repetir este proceso las veces que sea necesario hasta que se obtenga una tasa de flujo apropiada, para cada uno de los restrictores de flujo.

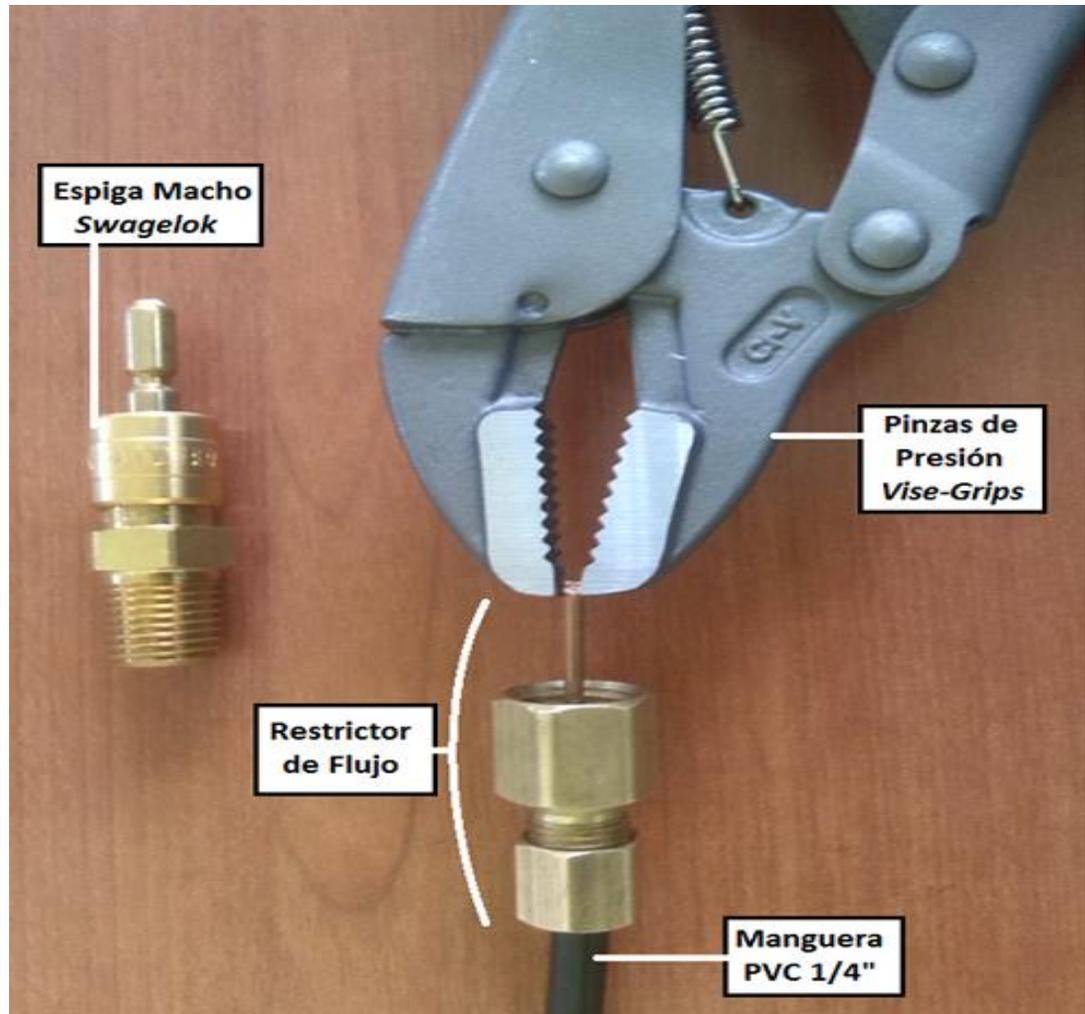


Figura 4, Proceso de Ajuste de Restrictores de Flujo (Fuente: elaboración propia).

Antes de iniciar el muestreo, como medida de control de calidad, se evaluó la conductancia final de cada uno de los 32 restrictores de flujo elaborados. Para esto, se repitió el proceso de evaluación de vacío residual utilizando la técnica anteriormente mencionada. Estos datos fueron registrados para compararlos con los valores obtenidos al finalizar el muestreo.

Materiales:

- Restrictores/reguladores de flujo de aire compuestos por:
 - 1) Conector recto bronce de tubo de 1/4'' de diámetro externo a rosca hembra 1/8'' NPT;
 - 2) Tubo capilar de cobre;
 - 3) Pieza tapón de cabeza hexagonal de rosca 1/8'' NPT;
 - 4) Anillas de compresión de cobre, 1/8''
 - 5) Insertos de cobre para manguera 1/8''
 - 6) Manguera de PVC TPU 6*1 10 bar, de 1/4 pulgada.
 - 7) Espiga macho *Swagelok*, código B-QC4-S-4PM.

- Retículo de vacío.

- Pinza de presión tipo *Vise-Grips*.

- Alicates y llaves hexagonales.

- Resina epoxi.

- Cinta teflón.

- Vacuómetro digital, modelo *BluVac Professional* de *AccuTools*®.

- Manómetro digital de presión diferencial, marca *Fisherbrand*™ *Traceable*™.

- Cuaderno de apuntes.

d. Período de adaptación de los animales.

Dos lotes sembrados de pasto, ubicados en el área de Lechería del Centro de Producción Animal del IDIAF, se prepararon para que sirvan como los potreros en donde apacentaron las novillas. Se tomaron las dimensiones de los terrenos utilizando una cinta métrica de 50 m, y se determinó que el primer y segundo lote tenía un área de 4700 m² y de 8946 m², respectivamente. Luego, el terreno fue fertilizado.

Para determinar la producción de biomasa en cada lote, se tomaron seis muestras de hierba cortadas a 5 cm del suelo, dentro de un marco de 1/2m² de área. Estas muestras fueron pesadas, determinándose que en el primer terreno había una disponibilidad de materia verde de 1.02 kg/m², y en el segundo terreno había una disponibilidad de materia verde de 0.57 kg/m².

Cada terreno fue dividido en cinco partes con la misma área, resultando en un total de diez potreros en los cuales se instaló un sistema de cercos eléctricos alimentado por energía solar. Para asegurar el funcionamiento del cerco eléctrico, se utilizó un voltímetro para medir la corriente circulante en las líneas del circuito.

Según las recomendaciones, el día 10 de enero del año 2019 las novillas fueron pesadas para asignarlas a los dos diferentes grupos mediante el Método Reversado, para que así el promedio de los pesos en cada grupo fuera similar (García-Lagombra, 2019). Se trasladaron al cepo para evaluar el estado de gestación. Las novillas gestantes fueron excluidas del ensayo, al igual que las que

tenían un temperamento muy fuerte o alguna otra característica que no permitiera su inclusión en la experimentación.

El día 26 de marzo del año 2019 fueron pesadas para confirmar los pesos nuevamente y se trasladaron al cepo para colocar los arneses en las cabezas de cada una. Para facilitar la identificación de los animales, se asignaron arneses de color rojo para las novillas que consumirían exclusivamente hierba (de pastoreo en el día y hierba Merker (*Pennisetum purpureum*) picada durante la noche), y arneses de color azul para las novillas que, además de consumir hierba, se les proporcionaría un suplemento alimenticio preparado a base de fórmula (ofreciendo aproximadamente 2.3 kg de alimento por cada animal).

Para el día 6 de mayo del 2019, se inició la adaptación de los animales al pastoreo con cerco eléctrico y los tratamientos alimentarios. Fueron trasladados al cepo para el pesaje. También, se sujetó un porta-tubos a los lados de la cabeza de cada animal, ajustando al arnés con broches y cintas *tie-wraps*.

En cada porta tubos se introdujo uno de los recipientes colectores defectuosos que no pasaron la prueba de estanqueidad, o un objeto con peso similar (bolsas rellenas de arena de 1.2 lb.) para que los animales se adaptaran a la presencia de objetos extraños sobre su cuello y cabeza, como ha sido recomendado en estudios anteriores (Johnson, Westberg, Michal & Cossalman, 2007, p. 48).

Durante el período de adaptación, se observó la respuesta de los animales al cambio de dieta. Solo se observó una leve diarrea en los animales del grupo que

consumió el suplemento alimenticio, la cual había cesado completamente para el tercer día.

Materiales:

- Cinta métrica para medición de terrenos, 50 m.
- Machete/tijeras para corte de hierba.
- Bolsas plásticas.
- Balanza de reloj colgante.
- Marco hecho con varillas metálicas, de $\frac{1}{2}$ m² de área.
- Estacas de madera.
- Kit de instalación de cerco eléctrico.
- Panel solar generador de electricidad.
- Alambre metálico conductor de electricidad.
- Pinzas corta-alambres.
- Voltímetro.
- Báscula digital para pesar ganado.
- Cuaderno de apuntes.
- Arnéses con uniones de velcro y hebilla para ajuste según tamaño de cada animal, de colores rojo y azul.

- Porta-tubos con fondo de tela reforzada y broches para acoplarse al arnés.
- Recipientes colectores: cilindros metálicos (500 ml) de acero inoxidable con base y tapa.
- Bolsas plásticas llenas de arena, con un peso de 1.2 lb.
- Cintas *tie-wrap* plásticas descartables.
- Suplemento alimenticio concentrado preparado a base de fórmula.
- Sacos/bolsas para almacenar alimento.

e. Colocación de tubos de permeación de SF₆ en el rumen.

Este procedimiento se realizó también el día 6 de mayo del 2019, para lograr una estabilización de la concentración de SF₆ en el rumen antes del inicio de las fases de muestreo.

Para seleccionar los tubos, se tomó en cuenta su tasa de liberación (Anexo 1). Los tubos con la tasa muy elevada o disminuida no fueron utilizados. Los tubos seleccionados fueron asignados a cada animal al azar, previo a la colocación en el rumen.

Se utilizó un lanza-bolos manual para introducir los tubos por la boca de los rumiantes, teniendo en cuenta de que los animales los hubieran tragado y no hayan sido expulsados. Al momento de la inserción, se registró la identificación del animal y del tubo introducido en el mismo.

Según lo recomendado por el protocolo de Uruguay (Ciganda, 2015) como control de calidad, en cada grupo se seleccionó un «animal control» al cual no se le dosificó con un tubo de permeación de SF₆ pero se le colectó el CH₄ al igual que el resto de los animales en experimentación. Al contar con los datos de las concentraciones de CH₄ de estos animales control se pudieron comparar con los datos de concentraciones de CH₄ obtenidos en los otros animales, para evaluar que sean similares. De igual forma, las concentraciones de SF₆ obtenidas a partir de estos animales deben ser iguales o similares a las concentraciones de SF₆ en las muestras ambientales.

Materiales:

- Tubos de permeación (o cápsulas) rellenos de SF₆.
- Lanza-bolos manual.
- Lápiz y papel.
- Cuaderno de apuntes.

f. Colocación de los recipientes colectores de metano en los animales.

Durante la Fase I, que comprendió los días del 13 al 17 de mayo 2019, se instalaron en los animales un total de 28 recipientes colectores (dos recipientes por animal). Para las muestras de aire ambiental, se emplearon dos recipientes colectores.

En la Fase II, que se llevó a cabo los días 3 al 7 de junio del 2019, se instalaron en los animales un total de 10 recipientes colectores (un recipiente por animal). Para las muestras de aire ambiental, se emplearon dos recipientes colectores.

Para la Fase III, efectuada en los días 24 al 28 de junio del 2019, se instalaron 10 recipientes colectores, un recipiente por animal. Para el muestreo de aire ambiental, solo se utilizó un recipiente colector.

Antes de colocar los recipientes colectores, estos se limpiaron con gas nitrógeno (N_2) de alta pureza para expulsar la mayor cantidad de gases residuales. Para esto, cada recipiente fue conectado al retículo de vacío habilitando las llaves de entrada del N_2 y llenado hasta que el manómetro indicara un valor de -200 a -500 mbar de presión. Se cerró la llave de pasaje del N_2 y se volvió a evacuar nuevamente el recipiente, a modo de enjuague.

Luego de evacuar el N_2 del recipiente, sin desconectar del retículo, se encendió la bomba de vacío hasta efectuar un nivel de vacío inferior a 1.0 mbar indicado por el vacuómetro.

Nuevamente, se limpió el recipiente con N_2 y se repitió el vaciado con la bomba de vacío hasta obtener un valor inferior a 1.0 mbar en el vacuómetro. Se desconectó del retículo y el recipiente fue preparado para el transporte, insertándolo en un porta-tubos ya numerado. Se prepararon dos recipientes colectores por animal.

El día del inicio del muestreo se llevaron los animales al cepo para un pesaje. Estando ahí, se retiraron los recipientes/sacos utilizados en la adaptación y se

colocaron los dos recipientes al vacío a cada lado de la cabeza/cuello del animal, ajustándolos con cintas *tie-wrap* plásticas y cinta adhesiva.

Para colocar el restrictor de flujo, el extremo de la manguera con el acople macho fue pasado hacia el otro costado del animal. La manguera fue sujeta al arnés con cintas *tie-wrap*. El otro extremo de la manguera de PVC (el punto de muestreo) se colocó bien cerca de los ollares del animal dentro de un trozo de caño transparente de PVC. Este caño estuvo sellado en un extremo con tela impermeable al agua y permeable al aire. El caño de PVC estuvo sujeto al soporte de cuero enganchado al arnés (Figura 5).

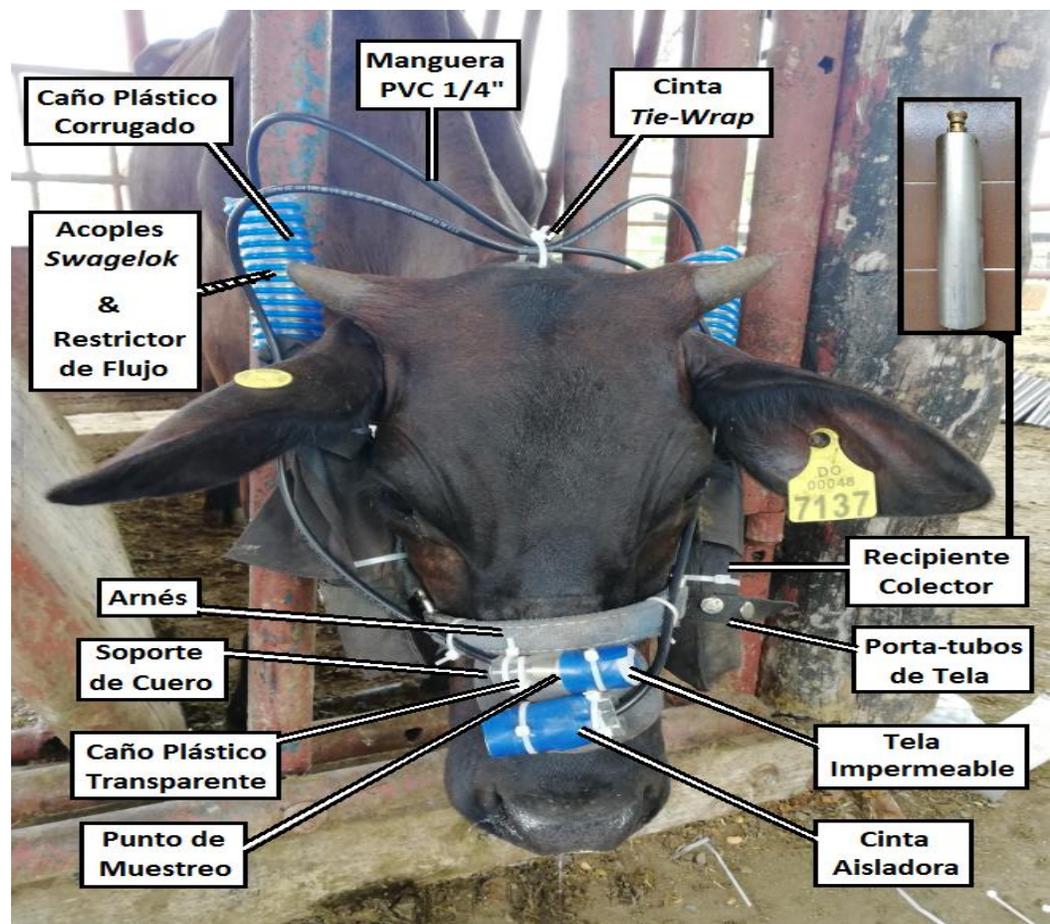


Figura 5, Sistema Completo de Colección de CH_4 Entérico, Instalado en una Novilla (Fuente: elaboración propia).

Al terminar de sujetar las mangueras, se conecta la espiga (conector macho) del restrictor de flujo con la entrada hembra del recipiente colector. En esta conexión, se coloca un trozo de caño corrugado (15 cm), para protegerla de posibles golpes.

En cada operación, se registró la identificación (número) del animal, número de recipiente colector, número de restrictor correspondiente a cada recipiente, y la hora de instalación.

Para el muestreo de aire ambiental, como control de las concentraciones atmosféricas de CH_4 y de SF_6 , se tomaron dos recipientes colectores al azar y se conectaron sus respectivos restrictores. Fueron sujetos a un arnés y enganchados en diferentes puntos del área del experimento (Figura 6).



Figura 6, Sistemas Colectores de Aire Ambiental, Colocados en el Potrero (A) y en los Establos (B) (Fuente: elaboración propia).

Cuando los sistemas de colección de gases estuvieron colocados en todas las novillas, estas fueron trasladadas al potrero para iniciar el pastoreo. Conjunto a los

animales, se llevaron los recipientes colectores de aire ambiental y se colocaron en dos puntos del perímetro del potrero (Figura 6).

Al finalizar el día, todos los animales fueron llevados de regreso a los establos, en donde se les ofreció agua y 42 kg de hierba Merker picada para su consumo. En este momento, se evaluó rápidamente la integridad de los sistemas de colección por observación.

A la mañana siguiente, se separaron los animales por grupo, como se estuvo haciendo desde la adaptación a los alimentos, y se les ofreció el suplemento a las novillas con arnés azul. Cuando terminaron con el alimento, todas las novillas fueron llevadas al potrero para continuar con el pastoreo, trasladándose junto con ellas los colectores de aire ambiental. Este ciclo de pastoreo se repitió diariamente, hasta concluir con el período de muestreo.

Materiales:

- Recipientes colectores.
- Tanque de gas nitrógeno (N_2) de alta pureza con regulador de presión con conexión al retículo de vacío.
- Retículo de vacío (Figura 2).
- Bomba de alto vacío, marca *Savant* modelo VP-190.
- Vacuómetro digital, modelo *BluVac Professional* de *AccuTools*®.
- Manómetro digital de presión diferencial, marca *Fisherbrand*™ *Traceable*™.
- Cintas *tie-wrap* plásticas descartables.

- Porta-tubos con fondo de tela reforzada y broches para acoplarse al arnés.
- Soporte de cuero con ajuste al arnés con remaches, para colocación de puntos de muestreo de aire protegidos por caños plásticos.
- Trozos de 10 cm de caño plástico transparente para protección de restrictores.
- Tela impermeable al agua pero permeable al aire para protección del punto de muestreo del restrictor.
- Manguera de PVC TPU 6*1 10 bar, de 1/4 pulgada que conecta acople macho del recipiente colector de metano con restrictor de entrada de aire.
- Restrictores/reguladores de flujo de aire previamente preparados.
- Cinta de papel para protección de restrictores.
- Cinta aisladora para ajustar tela a los caños plásticos.
- Manguera de caño plástico corrugado, 15 cm por animal.
- Navajas.
- Cuaderno de apuntes.
- Cinta adhesiva *duct tape*.

g. Retiro de recipientes colectores.

Al final del período de colección de gas de cuatro días (96 horas) establecido para el experimento, los animales se llevaron al cepo donde se retiraron cuidadosamente los recipientes colectores conjuntamente con los acoples, mangueras PVC y restrictores de aire.

Inmediatamente retirados los sistemas colectores de gas, se desconectó del recipiente colector la espiga macho de la manguera de PVC-restrictor, registrándose la hora y la fecha. Todos los componentes del equipo colector fueron trasladados al laboratorio de gases, donde se evaluó el estado de los recipientes, acoples y mangueras. Se identificaron los materiales con averías que hubieran dificultado la colecta de gas.

Materiales:

- Tijeras metálicas.
- Pinzas corta-alambres.
- Cuaderno de apuntes.
- Cajas para transporte de equipos.

h. Preparación de muestras y extracción de sub-muestras.

Antes de conectar los recipientes al retículo, en cada ocasión se encendió la bomba de vacío hasta obtener un valor inferior a 1.0 mbar con el vacuómetro, eliminando el aire residual en el retículo.

Cada recipiente colector (incluyendo los de aire ambiental) fue conectado al retículo de vacío, donde se midió su presión residual utilizando el manómetro y los valores obtenidos en mbar fueron registrados como «Presión inicial» (P_i). Cada recipiente se mantuvo conectado al retículo para ser sobre presurizado con N_2 , habilitando las llaves de entrada del N_2 y llenando el recipiente (hasta que el

manómetro indicara -200 a -500 mbar aproximadamente). Se registró ese valor como «Presión final» (Pf) y luego se desconectaron los recipientes.

En cada caso, se observó si los valores de Pi en los recipientes fueron similares a los valores de presión residual obtenidos previamente al evaluar la conductancia de los restrictores, lo que estaría indicando que la muestra obtenida es viable.

Si el valor de Pi fue próximo al valor de presión atmosférica (0 mbar en el manómetro), se estaría indicando un escape en las vías. En cambio, si el valor de Pi se acercó demasiado al valor de presión al vacío (~1030 mbar en el manómetro), se estaría indicando un bloqueo en las vías colectoras. Los recipientes que presentaron estas características fueron registrados y sus datos fueron desestimados.

Para la Fase I, de los 28 recipientes instalados en los animales al momento de la evaluación de la presión residual resultaron viables ocho de ellos, tres de los animales del grupo azul (alimento), cuatro de los animales del grupo rojo (dos del mismo animal, aunque posteriormente solo uno de estos arrojó datos válidos), y uno de los animales control.

Para la Fase II, se determinó que ambos sistemas de colección de gas ambiental mantuvieron una presión adecuada, como había ocurrido en la primera fase. De los diez recipientes colectores colocados en los animales, resultaron viables seis, dos de los animales del grupo azul, tres de los animales del grupo rojo, y uno de los animales control.

En la Fase III, resultaron viables tres recipientes del grupo que consumió solo pasto (posteriormente al evaluar las emisiones solo uno arrojó datos válidos) y cuatro del grupo que consumió pasto más el suplemento con monensina. El recipiente colector de aire atmosférico funcionó correctamente.

Se inspeccionaron las líneas de los sistemas de colección averiados y se determinó que los recipientes que no mantuvieron una presión adecuada habían sufrido un daño interno, causado por fuertes impactos por parte de los animales, que afectó a los restrictores de flujo. Específicamente, la unión del capilar de cobre con la manguera de la línea de gas (Figura 3) ensamblada con resina epoxi solidificada, estaba rota en todos los casos.

Al finalizar con los recipientes, se ensamblaron los viales de 22 ml y se les realizó el vacío a cada uno, utilizando una jeringa conectada al retículo para perforar los septos y evacuar el volumen interno de los viales hasta que el vacuómetro hubiera mostrado un valor próximo a 0 mbar. Luego, al observar que los septos seguían con una apariencia cóncava, se pudo determinar que el vacío se mantuvo en cada uno de los viales.

Se esperaron dos días para extraer las sub-muestras de los recipientes, para lograr una homogenización de los gases dentro del recipiente.

Se elaboró un «adaptador» o pieza de acople al recipiente colector que permitió la extracción de la muestra desde el recipiente, y el llenado de los viales que serán luego utilizados para el análisis de la muestra en el cromatógrafo de gases.

Este adaptador se preparó utilizando una manguera de PVC (TPU 6*1 10 bar, de 1/4 pulgada) de 25 cm aproximadamente. En un extremo fue colocada una espiga/conector macho *Swagelok*; en el otro extremo se colocó una mariposa de tres vías: vía 1 conectada a manguera PVC, vía 2 conectada a una jeringa de 60 ml, y vía 3 conectada a una aguja de 23G (Figura 7).

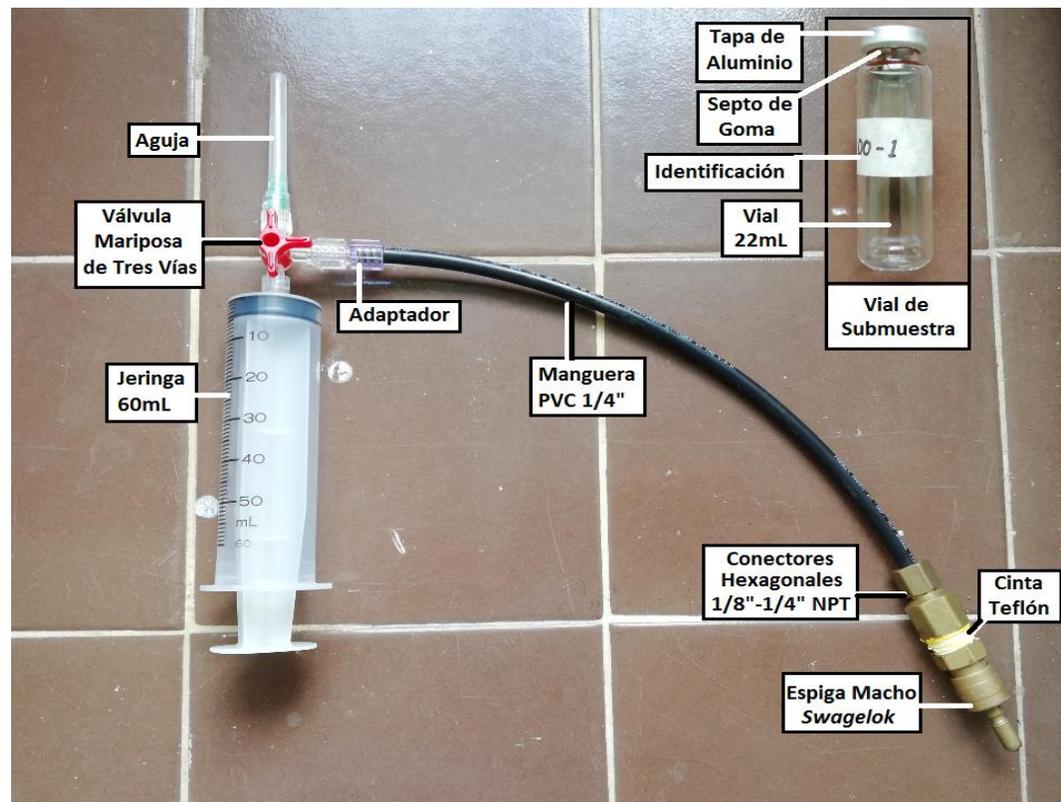


Figura 7, Configuración de Adaptador/Extractor de Sub-muestras y Vial Ensamblado (Fuente: elaboración propia).

Luego de armado el «adaptador», se conectó la espiga al acople hembra del recipiente colector con la mariposa de tres vías con el pasaje de aire cerrado hacia jeringa y aguja. Para extraer cada sub-muestra se siguieron los siguientes pasos:

1. Habilitar con la mariposa el pasaje de aire del recipiente colector hacia la jeringa hasta que complete 30 ml, y cerrar mariposa.

2. Los primeros 30 ml de cada recipiente deben ser descartados ya que el volumen residual de la manguera puede alterar las concentraciones.
3. Insertar la aguja en el septo de un vial de 22 ml previamente vaciado.
4. Abrir el pasaje de la muestra de la jeringa hacia el vial (a través de la aguja) y cerrar luego de que se haya vaciado el contenido de la jeringa en el vial.
5. Retirar el vial (el mismo quedará a sobrepresión).
6. Identificar el número del vial, asociado al número de recipiente colector/muestra.
7. Repetir con otro vial, sin desconectar el recipiente del adaptador.

De cada recipiente colector, se tomaron cuatro sub-muestras que fueron pasadas a los viales (Anexo 2). Adicionalmente, se tomaron cuatro muestras del gas nitrógeno (N_2) puro como control de calidad (dos antes y dos después de preparar las sub-muestras de metano). En estas, las concentraciones de metano (CH_4) y de hexafluoruro de azufre (SF_6) deben ser mínimas.

Antes de empacar los viales, se selló cada uno con silicona (en el punto de perforación del septo) para evitar la contaminación cruzada con el contenido de otros viales, debido a que los cambios de presión atmosférica durante el transporte aéreo pueden causar un escape o entrada de gases a través de los septos.

Se prepararon 140 viales conteniendo las sub-muestras a sobrepresión. Fueron enviados a través de un Courier aéreo hacia Argentina, para el análisis de su concentración de CH_4 y SF_6 por cromatografía gaseosa.

Materiales:

- Retículo de vacío.
- Bomba de alto vacío, marca *Savant* modelo VP-190.
- Vacuómetro digital, modelo *BluVac Professional* de *AccuTools*®.
- Manómetro digital de presión diferencial, marca *Fisherbrand*™ *Traceable*™.
- Cuaderno de apuntes.
- Recipientes colectores.
- Tanque de gas nitrógeno (N₂) de alta pureza con regulador de presión con conexión al retículo de vacío.
- Adaptador para extracción de sub-muestras elaborado con:
 - 1) Espiga macho *Swagelok*, código B-QC4-S-4PM.
 - 2) Conector recto bronce de tubo de 1/4'' de diámetro externo a rosca hembra 1/8'' NPT.
 - 3) Pieza tapón de cabeza hexagonal de rosca 1/8'' NPT.
 - 4) Anillas de compresión de cobre, 1/8''.
 - 5) Insertos de cobre para manguera 1/8''.
 - 6) Manguera de PVC TPU 6*1 10 bar, de 1/4 pulgada.
 - 7) Cinta teflón para las uniones de la espiga.
 - 8) Jeringa plástica 60 ml con aguja.
 - 9) Mariposa de tres vías para conectar a jeringa y a la aguja.
- Alicates y llaves hexagonales.

- Viales para gas de modelo y tamaño que correspondan al cromatógrafo de gases a utilizar (Recomendación: Viales *PerkinElmer* 22 ml).
- Septos para viales.
- Tapas de aluminio para sello de viales.
- Herramienta crimpadora de tapas de viales.
- Gafas de seguridad.
- Cinta adhesiva *masking tape*.
- Marcador permanente.
- Caja de cartón para transporte de viales.
- Papel plástico de burbujas.
- Pistola de silicona caliente.
- Tirillas de silicona.

i. Cálculo de la emisión de CH₄.

Para el cálculo de las emisiones de metano, se necesitaron los siguientes datos:

- Tasa de liberación de SF₆ (SF₆ TL) de cada tubo de permeación correspondiente a cada animal.
- Valores de concentración de CH₄ (ppm) y de SF₆ (ppt) de cada una de las sub-muestras de emisiones bovinas, colectadas en viales y analizadas por cromatografía gaseosa.

- Valores de concentración de CH₄ (ppm) y de SF₆ (ppt) de las muestras de aire atmosférico, colectadas en viales y analizadas por cromatografía gaseosa (en caso de utilizarse dos recipientes colectores ambientales en una etapa, se calculó el promedio de los resultados de las sub-muestras).
- Factor de corrección (FC) de las concentraciones (debido a la dilución realizada por la sobre-presurización de los recipientes colectores con N₂). Se calculó utilizando los datos anteriormente registrados de presión Pi y Pf: FC= Pf/Pi; multiplicar cada valor de concentración por FC.

Una vez utilizado el FC para corregir las concentraciones de CH₄ y SF₆ entéricos (CH_{4ent} y SF_{6ent}) de las sub-muestras colectadas de los animales y las concentraciones atmosféricas de control (CH_{4atm} y SF_{6atm}), se calculó la emisión diaria de CH₄ entérico utilizando la siguiente ecuación (Figura 8) que incluye la corrección por los pesos moleculares (PM) de cada gas (PM CH₄= 16 y PM SF₆=146):

$$\text{CH}_4 \text{ (g día}^{-1}\text{)} = \text{SF}_6 \text{ TL (mg día}^{-1}\text{)} * \left[\frac{\text{CH}_4 \text{ ent} - \text{CH}_4 \text{ atm (ppm)}}{\text{SF}_6 \text{ ent} - \text{SF}_6 \text{ atm (ppt)}} \right] * \left[\frac{16 \text{ (PM CH}_4\text{)}}{146 \text{ (PM SF}_6\text{)}} \right] * 1000$$

Figura 8, Ecuación para el Cálculo de Emisiones de CH₄ (Fuente: Ciganda, 2015).

Finalmente, todos los datos obtenidos a partir de las 140 sub-muestras fueron tabulados en una hoja de cálculo del programa *Microsoft Excel*. Se utilizó la misma herramienta para aplicar las ecuaciones necesarias para el análisis de los resultados de emisión de CH₄ Entérico (Anexo 3).

3. Determinación del consumo de materia seca.

Para estimar el consumo de materia seca en pastoreo por las novillas, se multiplicó el peso de los animales por una constante de 2.5%. Este porcentaje refleja la suposición de que una novilla de doble propósito en pastoreo libre consumirá el 2.5 por ciento en materia seca de su peso vivo (PV) diariamente, basado en un estudio anterior que trabajó con animales de características similares y obtuvo valores de consumo de 2.1 a 2.75 por ciento (Montenegro-Ballesteros & Barrantes-Guevara, 2016).

A los animales que además de estar en pastoreo se les ofreció un suplemento alimenticio concentrado a base de fórmula, se les realizó la operación anterior y al producto se le sumaron 2.27 kg de materia seca, lo que hace referencia a la cantidad de materia seca de alimento concentrado ofrecido a cada novilla de dicho grupo.

Para la determinación del consumo de materia seca fue necesario tomar muestras de los forrajes, de la hierba Merker picada, del alimento y de las heces de las novillas.

Los forrajes utilizados fueron muestreados al inicio y al final del ensayo utilizando una tijera, tomando las muestras a una altura de cinco (5) centímetros (cm), en una área de medio (0.5) metro cuadrado (m²). El objetivo de los muestreos fue determinar la producción por área de superficie y seleccionar una alícuota para enviar al laboratorio.

Utilizando el mismo método de muestreo, se tomaron y pesaron muestras de forraje al inicio y al final del pastoreo en cada potrero, para obtener más datos que facilitaran la estimación del consumo en el período de pastoreo (Anexo 4).

Se tomaron cuatro muestras del alimento a base de fórmula (Anexo 5) luego de que este fue preparado y sometido a un proceso de homogenización. Estas muestras fueron almacenadas por un día bajo refrigeración en una nevera para luego ser enviadas al laboratorio.

Para el muestreo de la hierba Merker picada, inmediatamente luego de que esta fue pasada por el triturador, se llenaron dos bolsas con aproximadamente 1 kg cada una de materia verde. Fueron selladas y almacenadas en un refrigerador para ser enviadas al laboratorio al próximo día.

Las muestras de heces fueron tomadas directamente del recto de cada animal para evitar la contaminación del material. Tres animales de cada grupo fueron seleccionados al azar para ser muestreados, tomando dos muestras fecales por animal, para un total de 12 muestras fecales. Fueron colocadas en contenedores de plástico sellables, y almacenadas en refrigeración hasta su posterior análisis.

El objetivo de estas muestras de heces fue, posteriormente, estimar la digestibilidad por el método de las proporciones utilizando marcadores, utilizado para animales en pastoreo. Como marcador interno, se midieron las concentraciones de Fibra Detergente Neutro (FDN) y Fibra Detergente Ácido (FDA) tanto en los alimentos como en las heces.

4. Análisis de laboratorio.

Para los forrajes y las heces se determinó la materia seca, humedad, proteínas, carbohidratos, grasas, cenizas, fibra cruda, Fibra Detergente Neutro (FDN) y Fibra Detergente Acido (FDA).

Las sub-muestras de gas fueron evaluadas por el método de cromatografía gaseosa para determinar los niveles de concentración de metano y hexafluoruro de azufre.

5. Análisis estadístico.

De acuerdo a los datos revisados, se procedió a realizar diferentes análisis estadísticos para comparar los resultados de la producción de metano entérico con tratamientos básicos sobre solo pasturas, pasturas + alimento concentrado, y pasturas + alimento concentrado + monensina sódica. Para el análisis de varianza (ANDEVA) se utilizó el programa *InfoStat*.

Las medias fueron comparadas a través de la prueba de separación de medias (Tukey Alfa=0.05). En el caso de las variables asociadas al consumo, se consideró el animal como unidad experimental mientras que para las variables asociadas a la producción de metano se considera cada grupo de animales como unidad experimental.

TERCERA PARTE

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPÍTULO III: RESULTADOS

A. Concentraciones de CH₄ y de SF₆.

Con relación a los análisis de metano (CH₄) y de hexafluoruro de azufre (SF₆), en esta investigación se pudieron recolectar 140 sub-muestras gaseosas que se analizaron por cromatografía de gas basándose en los siguientes parámetros: Área CH₄ [μV.s], concentración de CH₄ [ppm], Área SF₆ [μV.s] y concentración de SF₆ [ppt] (Anexo 6).

1. Concentraciones atmosféricas de gases de efecto invernadero.

Se observó que los resultados de las concentraciones ambientales de metano (CH₄) y de hexafluoruro de azufre (SF₆) varían entre cada fase, al igual que con las otras muestras control (Tabla 1, Tabla 2 y Tabla 3). Estos resultados se agruparon en tres fases:

En la Fase I, luego de aplicar los factores de corrección a los resultados recibidos, el promedio de las concentraciones de CH₄ en las muestras atmosféricas fue de 9.48 ppm, y de las concentraciones atmosféricas de SF₆ fue de 7.17 ppt.

En la Fase II, el promedio de las concentraciones atmosféricas de CH₄ s fue de 14.30 ppm, y en el caso del SF₆ fue de 12.22 ppt.

En la Fase III, el promedio de las concentraciones atmosféricas de CH₄ s fue de 10.94 ppm, y de las de SF₆ fue de 20.95 ppt.

Tabla 1 Resultado de la evaluación de concentraciones atmosféricas de CH₄ y SF₆

Sub-muestra	Concentración de CH ₄ en la Fase I (ppm)	Concentración de SF ₆ en la Fase I (ppt)	Concentración de CH ₄ en la Fase II (ppm)	Concentración de SF ₆ en la Fase II (ppt)	Concentración de CH ₄ en la Fase III (ppm)	Concentración de SF ₆ en la Fase III (ppt)
1	8.79	6.92	17.89	9.67	10.75	22.66
2	6.09	6.97	18.29	11.96	11.27	21.85
3	9.07	7.17	16.98	19.97	11.17	16.57
4	9.78	6.88	18.05	13.99	10.59	22.73
5	11.22	7.53	11.56	9.90	--	--
6	11.16	7.98	10.25	10.26	--	--
7	9.93	7.93	10.36	11.04	--	--
8	9.76	5.94	11.01	10.98	--	--
Promedio	9.48	7.17	14.30	12.22	10.94	20.95

ppm=partes por millón. ppt= partes por trillón. En la Fase III solo se evaluaron cuatro sub-muestras de aire ambiental.

2. Concentraciones de CH₄ y SF₆ detectadas en muestras de gas nitrógeno.

Para las sub-muestras enviadas del gas nitrógeno puro (N₂) que se utilizó para diluir las muestras tomadas con los recipientes colectores, en la Fase I se obtuvo una concentración promedio de 0.98 ppm de CH₄ y 1.59 ppt de SF₆. En la Fase II se obtuvieron valores similares, siendo las concentraciones 1.15 ppm y 1.75 ppt de CH₄ y SF₆, respectivamente (Tabla 2). No fue necesario tomar estas muestras en la Fase III.

Tabla 2 Resultados de las concentraciones control de CH₄ y SF₆ en el gas N₂.

Sub-muestra	Concentración de CH ₄ en la Fase I (ppm)	Concentración de SF ₆ en la Fase I (ppt)	Concentración de CH ₄ en la Fase II (ppm)	Concentración de SF ₆ en la Fase II (ppt)
00-1	0.98	1.54	1.17	1.14
00-2	1.06	1.36	1.07	2.17
00-3	1.08	1.99	1.22	2.32
00-4	0.81	1.46	1.13	1.38
Promedio	0.98	1.59	1.15	1.75

ppm=partes por millón. ppt= partes por trillón.

3. Concentraciones de CH₄ y SF₆ detectadas en muestras de animales control.

Al evaluar las muestras obtenidas a partir de los animales control, (a los que no se les administró la cápsula de SF₆) se determinó que en la Fase I las muestras del animal control arrojaron como resultados un promedio de 36.22 ppm de CH₄, y 12.55 ppt de SF₆. En la Fase II, de las muestras del animal control se obtuvo un promedio de concentraciones de 53.70 ppm de CH₄, y 19.81 ppt de SF₆ (Tabla 3). No se emplearon animales control en la Fase III.

Tabla 3 Resultados de las concentraciones de CH₄ y SF₆ emitidos por animales control.

Sub-muestra	Concentración de CH ₄ en la Fase I (ppm)	Concentración de SF ₆ en la Fase I (ppt)	Concentración de CH ₄ en la Fase II (ppm)	Concentración de SF ₆ en la Fase II (ppt)
A13-1	36.93	12.82	--	--
A13-2	35.65	13.08	--	--
A13-3	36.26	12.62	--	--
A13-4	36.03	11.69	--	--
B33-1	--	--	51.98	19.90
B33-2	--	--	54.72	19.22
B33-3	--	--	53.98	21.61
B33-4	--	--	54.12	18.51
Promedio	36.22	12.55	53.70	19.81

ppm=partes por millón. ppt= partes por trillón. Las sub-muestras A13 corresponden al animal control utilizado en la Fase I. Las sub-muestras B33 corresponden al animal control de la Fase II.

B. Emissiones de Metano.

En la Fase I, de las novillas del grupo de solo pastoreo, se obtuvo un promedio de producción de metano (CH₄) diaria de 105.32 g/día. De las novillas del grupo que consumió el alimento concentrado junto con pastoreo se obtuvo un promedio de producción de CH₄ diaria de 132.31 g/día (Tabla 4).

Tabla 4 Resultados de las emisiones de metano entérico en la Fase I.

Novilla	Emisión de CH ₄ en Pastoreo (g/día)	Emisión de CH ₄ con Concentrado (g/día)
7141	102.62	--
7938	103.65	--
7944	109.68	--
7137	--	102.12
0328	--	159.68
7923	--	135.12
Promedio	105.32	132.31

La identificación de las novillas está dada por los últimos cuatro dígitos de sus respectivos números de trazabilidad. Las emisiones de CH₄ están expresadas en gramos (g) de CH₄ emitidos por día (d).

En la Fase II, de las novillas del grupo de solo pastoreo, se obtuvo un promedio de producción de CH₄ diaria de 94.48 g/día. De las novillas del grupo que consumió el alimento concentrado junto con pastoreo se obtuvo un promedio de producción de CH₄ diaria de 122.29 g/día (Tabla 5).

Tabla 5 Resultados de las emisiones de metano entérico en la Fase II.

Novilla	Emisión de CH ₄ en Pastoreo (g/día)	Emisión de CH ₄ con Concentrado (g/día)
7141	97.07	--
7938	93.37	--
7944	92.99	--
7137	--	139.63
7923	--	104.94
Promedio	94.48	122.29

La identificación de las novillas está dada por los últimos cuatro dígitos de sus respectivos números de trazabilidad. Las emisiones de CH₄ están expresadas en gramos (g) de CH₄ emitidos por día (d).

En la Fase III, de las novillas del grupo de solo pastoreo, los datos de emisiones resultaron ser erráticos; solo uno de ellos fue considerado viable, con un dato arrojado de producción de CH₄ diaria de 191.32 g/día. De las novillas del grupo que consumió el alimento concentrado y monensina, se obtuvo un promedio de producción de CH₄ diaria de 95.53 g/día (Tabla 6).

Tabla 6 Resultados de las emisiones de metano entérico en la Fase III.

Novilla	Emisión de CH ₄ en Pastoreo (g/día)	Emisión de CH ₄ con Concentrado y Monensina (g/día)
7926	191.32	--
7141	--	71.27
0328	--	61.70
7923	--	97.23
7941	--	151.92
Promedio	191.32	95.53

La identificación de las novillas está dada por los últimos cuatro dígitos de sus respectivos números de trazabilidad. Las emisiones de CH₄ están expresadas en gramos de CH₄ emitidos por día.

C. Rendimiento de Emisiones de Metano.

En la Fase I, de las novillas del grupo de pastoreo exclusivo, el rendimiento de producción de metano (CH₄) en base a los estimados de materia seca ingerida (MSI) por cada animal arrojó un promedio de 18.67 g de CH₄/MSI/día, y el promedio del rendimiento de CH₄ en base al peso vivo (PV) del animal fue de 0.47 g de CH₄/PV/día. En cuanto a las novillas del grupo que consumió el suplemento alimenticio concentrado junto con pastoreo se obtuvo un promedio de rendimiento de 16.60 g de CH₄/MSI/día y de 0.58 g de CH₄/PV/día, para el rendimiento en base a MSI y PV por día, respectivamente (Tabla 7).

Tabla 7 Resultados del rendimiento de emisiones de CH₄ en la Fase I.

Novilla	Rendimiento de CH ₄ en base a materia seca ingerida, en pastoreo (g de CH ₄ /MSI/día)	Rendimiento de CH ₄ en base a peso vivo, en pastoreo (g de CH ₄ /PV/día)	Rendimiento de CH ₄ en base a materia seca ingerida, con concentrado (g de CH ₄ /MSI/día)	Rendimiento de CH ₄ en base a peso vivo, con concentrado (gCH ₄ /PV/día)
7141	26.66	0.67	--	--
7938	16.20	0.40	--	--
7944	13.17	0.33	--	--
7137	--	--	14.14	0.52
0328	--	--	21.31	0.76
7923	--	--	14.34	0.47
Promedio	18.67	0.47	16.60	0.58

La identificación de las novillas está dada por los últimos cuatro dígitos de sus respectivos números de trazabilidad. El Rendimiento de CH₄ está expresado en gramos (g) de CH₄/MSI/día (d) y en gramos (g) de CH₄/PV/día (d), para el rendimiento en base a MSI y PV por día, respectivamente.

En la Fase II, de las novillas del grupo de pastoreo exclusivo, el rendimiento de producción de CH₄ en base a los estimados de MSI por cada animal arrojó un promedio de 15.41 g de CH₄/MSI/día, y el promedio del rendimiento de CH₄ en base al PV del animal fue de 0.39 g de CH₄/PV/día. Para las novillas del grupo que consumió el suplemento alimenticio concentrado junto con pastoreo se obtuvo un promedio de rendimiento de 14.30 g de CH₄/MSI/día y de 0.49 g de CH₄/PV/día (Tabla 8).

Tabla 8 Resultados del rendimiento de emisiones de CH₄ en la Fase II.

Novilla	Rendimiento de CH ₄ en base a materia seca ingerida, en pastoreo (g de CH ₄ /MSI/día)	Rendimiento de CH ₄ en base a peso vivo, en pastoreo (g de CH ₄ /PV/día)	Rendimiento de CH ₄ en base a materia seca ingerida, con concentrado (g de CH ₄ /MSI/día)	Rendimiento de CH ₄ en base a peso vivo, con concentrado (gCH ₄ /PV/día)
7141	22.84	0.57	--	--
7938	13.15	0.33	--	--
7944	10.25	0.26	--	--
7137	--	--	18.57	0.66
7923	--	--	10.02	0.32
Promedio	15.41	0.39	14.30	0.49

La identificación de las novillas está dada por los últimos cuatro dígitos de sus respectivos números de trazabilidad. El Rendimiento de CH₄ está expresado en gramos de CH₄/MSI/día y en gramos de CH₄/PV/día, para el rendimiento en base a MSI y PV por día, respectivamente.

En la Fase III, la novilla de la cual se generaron datos viables de emisión, presentó un rendimiento de 23.69 g de CH₄/MSI/día, y de 0.59 g de CH₄/PV/día. De las novillas que consumieron el alimento concentrado + monensina, se obtuvo un promedio de rendimiento de 10.11g de CH₄/MSI/día y 0.34g de CH₄/PV/día (Tabla 9).

Tabla 9 Resultados del rendimiento de emisiones de CH₄ en la Fase III.

Novilla	Rendimiento de CH ₄ en base a materia seca ingerida, en pastoreo (g de CH ₄ /MSI/día)	Rendimiento de CH ₄ en base a peso vivo, en pastoreo (g de CH ₄ /PV/día)	Rendimiento de CH ₄ en base a materia seca ingerida, con concentrado y monensina (g de CH ₄ /MSI/día)	Rendimiento de CH ₄ en base a peso vivo, con concentrado y monensina (gCH ₄ /PV/día)
7926	23.69	0.59	--	--
7141	--	--	9.97	0.37
0328	--	--	7.42	0.25
7923	--	--	9.26	0.30
7941	--	--	13.79	0.43
Promedio	23.69	0.59	10.11	0.34

La identificación de las novillas está dada por los últimos cuatro dígitos de sus respectivos números de trazabilidad. El Rendimiento de CH₄ está expresado en gramos de CH₄/MSI/día y en gramos de CH₄/PV/día, para el rendimiento en base a MSI y PV por día, respectivamente. Nota: En esta fase el alimento concentrado incluía monensina sódica.

Al agrupar los resultados de todas las fases, se calculó que en los grupos de novillas que consumieron solo forraje hubo un promedio de emisiones de 112.96 gramos de CH₄/día, 17.99 gramos de CH₄ kg/MSI/día y 0.45 gramos CH₄/PV/día. En los grupos de novillas consumiendo forraje y alimento concentrado, se obtuvieron emisiones de 128.30 gramos CH₄/día, de 15.68 gramos de CH₄/kg de MSI/día y 0.55 gramos de CH₄/PV/día. En el grupo consumiendo alimento con monensina, se obtuvieron emisiones de 95.53 gramos de CH₄/día, de 10.11 gramos de CH₄/MSI/día y de 0.34 gramos de CH₄/PV/día.

D. Análisis Estadísticos

Con relación a los resultados del experimento para medir las emisiones de metano (CH₄) entérico en novillas, se procedió a realizar un análisis de datos comparando las emisiones de los animales consumiendo Solo Forrajes (A), Forrajes con Alimento Concentrado + Monensina (B) y Forrajes con Alimento Concentrado (C). De acuerdo a lo observado en el análisis de la varianza (ANDEVA) se pudo determinar que existen diferencias significativas entre los tratamientos. De inmediato se procedió a aplicar la prueba de separación de medias (Tukey Alfa=0.05) en la cual el tratamiento B (Forraje+Concentrado+Monensina) produjo el menor nivel de emisión de CH₄ en comparación con los tratamientos C (Forraje-Concentrado) y A (Solo Forraje), no habiendo significación entre estos dos últimos (Tabla 10).

Tabla 10 Análisis de la varianza (ANDEVA) y prueba de separación de medias, de la emisión de metano entérico en novillas en el experimento comparando el uso de forrajes, concentrado y monensina (Emisiones en gramos de metano entérico/kg MS consumido). Fuente: *InfoStat*. (Ver Anexo 8).

Trat	Medias	n	E.E.
B	12.52	16	1.31A
C	21.54	12	1.52 B
A	22.19	20	1.17 B

A: Solo Forraje. B: Forraje+Concentrado+Monensina. C: Forraje+Concentrado
Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Con relación a los datos presentados a continuación (Tabla 11), se realizó una comparación de las emisiones de CH₄ de los tratamientos mencionados en la Tabla 10 (A: Solo Forraje, B: Forraje + Concentrado + Monensina y C: Forraje + Concentrado) con relación al peso vivo de las novillas. De acuerdo a los resultados, también hubo una diferencia significativa entre los tratamientos, pero en este caso los tratamientos con forraje solo (A) y Forraje + Concentrado

+ Monensina (B), no tuvieron diferencias entre sí, pero estos dos tuvieron con el tratamiento de forraje + concentrado (C).

Tabla 11 Análisis de la varianza (ANDEVA) y prueba de separación de medias, de la emisión de metano entérico en novillas en el experimento comparando el uso de forrajes, concentrado y un ionóforo. (Emisiones en gramos de metano entérico/kg peso vivo (PV). Fuente: *InfoStat*. (Ver Anexo 9)

Trat	Medias	n	E.E.
B	0.42	16	0.04A
A	0.55	20	0.04A
C	0.73	12	0.05 B

A: Solo Forraje. B: Forraje+Concentrado+Monensina. C: Forraje+Concentrado
 Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$) Separación de medias (test: Tukey
 Alfa=0.05 DMS=0.14010)
 Error: 0.0256 gl: 45

De acuerdo a los resultados vistos en la Tabla 12, donde se compararon las emisiones de CH₄ del tratamiento Solo Forraje con el de Forraje + Concentrado + Monensina, basado en emisiones en gramos de CH₄ entérico/kg de materia seca (MS) consumido, se pudo notar que hubo una reducción significativa de las emisiones de CH₄ en niveles de 12.52 kg de MS en comparación con el 22.19 de solo forrajes, representado esto emisiones menores de 43.58%.

Tabla 12 Análisis de la varianza (ANDEVA) y prueba de separación de medias, de la emisión de metano entérico en novillas en el experimento comparando el uso de forrajes, concentrado y un ionóforo. (Emisiones en gramos de metano entérico/kg MS consumido). Fuente: *InfoStat*. (Ver Anexo 10)

Trat	Medias	n	E.E.
B	12.52	16	1.23A
A	22.19	20	1.10 B

A: Solo Forraje. B: Forraje+Concentrado+Monensina.
 Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

También, en la Tabla 13 se procedió a realizar la misma operación de la tabla anterior (Tabla 12), pero analizando los datos comparativos de forrajes (A) y Forraje-Concentrado-Monensina (B) basados en emisiones de gramos de CH₄ entérico/kg de peso vivo. De nuevo los datos fueron consistentes e indicaron que el tratamiento B (Forraje+Concentrado+Monensina), redujo significativamente los niveles de emisiones de CH₄ entérico con relación al tratamiento A (forrajes). Esto a todas luces, indica que al alimentar novillas con Forraje + Concentrado + Monensina las emisiones de CH₄ entérico se reducen (23.63%) en comparación a solo forrajes.

Tabla 13 Análisis de la varianza (ANDEVA) y prueba de separación de medias, de la emisión de metano entérico en novillas en el experimento comparando el uso de forrajes, concentrado y un ionóforo. (Emisiones en gramos de metano entérico/kg peso vivo (PV)). Fuente: *InfoStat*. (Ver Anexo 11)

Trat	Mediasn	E.E.	
B	0.42 16	0.03	A
A	0.55 20	0.03	B

A: Solo Forraje. B: Forraje+Concentrado+Monensina.

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

Separación de medias (Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=0.08604)

Error: 0.0159 gl: 34

E. Análisis Químico de Alimentos, Forrajes y Heces Bovinas.

Las muestras de alimento, de forrajes y de heces enviadas al laboratorio de la Junta Agroempresarial Dominicana (JAD) y al Laboratorio Veterinario Central (LAVECEN) fueron analizadas por duplicado (Anexo 7). Los resultados se presentan a continuación (Tabla 14 y Tabla 15):

Tabla 14 Análisis de las características nutricionales de los pastos decumbentes, *Pennisetum purpureum* y alimentos concentrados utilizados en el experimento sobre medición de emisiones de metano entérico en novillas bovinas mestizas de doble propósito, en condiciones de pastoreo en la República Dominicana.

Análisis nutricional	Pastos decumbentes (%)	<i>Pennisetum purpureum</i> (Merker) (%)	Alimento concentrado (%)
Humedad	67.15	88.38	13.32
Materia seca	32.85	11.62	86.68
Carbohidratos	86.60	83	61.63
Proteínas	5.39	4.05	10.48
Extracto etéreo	1.62	1.55	4.50
Cenizas	9.38	11.39	10.06
Fibra Cruda	32.04	41.5	12.40
Fibra Neutro Detergente	66.03	68.03	20.48
Fibra Ácida Detergente	44.44	43..27	12.24

Valores expresados en porcentaje por peso (%p/p).

Tabla 15 Resultados de análisis de heces bovinas del grupo de pastoreo y con alimento, en el experimento sobre medición de emisiones de metano entérico en novillas bovinas mestizas de doble propósito, en condiciones de pastoreo en la República Dominicana.

Análisis nutricional	Grupo solo Forraje (%)	Grupo Forraje+Concentrado(%)
Humedad	84.64	82.40
Materia Seca	15.36	17.60
Carbohidratos	11.04	12.48
Proteínas	2.00	1.72
Extracto etéreo	0.16	1.62
Cenizas	2.26	3.16
Fibra Cruda	3.70	3.95
Fibra Neutro Detergente	3.42	4.96
Fibra Ácido Detergente	1.66	2.28

Valores expresados en porcentaje por peso (%p/p).

CAPÍTULO IV: DISCUSIÓN

Esta investigación figura como la primera instancia en la que se aplica la técnica de trazado con hexafluoruro de azufre (SF_6) para obtener datos reales de las emisiones de metano (CH_4) entérico de origen bovino, en la República Dominicana. Con esto se busca obtener experiencia que sirva como base para futuras investigaciones de este tipo, que a su vez servirán para generar información sobre las emisiones nacionales de este gas según lo recomendado por el IPCC para los inventarios de emisión de gases con efecto invernadero.

Se buscó adaptar el protocolo de la técnica de SF_6 presentado por Ciganda (2015) a las condiciones presentes en el país, utilizando los materiales, equipos e instalaciones disponibles. Entre las modificaciones realizadas, se destaca la implementación de otro modelo de restrictor de flujo basado en tubos capilares comprimidos.

Estos restrictores resultaron ser efectivos en las condiciones controladas de laboratorio, aunque el proceso de elaboración de estos fue muy extenso y laborioso debido a la necesidad de realizar cada calibración y ajuste de forma individual, dado por la poca precisión del sistema de medición de vacío utilizado (detalles en el punto 2-c de la metodología, Capítulo II).

Se pudo determinar que los colectores colocados en las novillas detectaron cantidades apreciables de metano entérico (CH_4) y hexafluoruro de azufre (SF_6), tanto en el aire exhalado por las novillas, como en las muestras de aire ambiental de control (cuyas concentraciones, como era esperado, fueron menores en estas últimas en comparación a las de origen animal).

Los resultados de emisión diaria de CH₄ por animal obtenidos en este ensayo son similares a los valores obtenidos en otras investigaciones en las que se usaron animales y alimentos de características similares a los evaluados en esta investigación (Montenegro-Ballesteros & Barrantes-Guevara, 2016; Morrison *et al.*, 2017), lo que puede sustentar la confiabilidad de estos resultados y de los métodos utilizados.

Con respecto a la relación de las emisiones de CH₄ con el alimento consumido, es importante mencionar que la producción de CH₄ está predominantemente relacionada con la cantidad de alimento ingerido más que con las propiedades inherentes de la dieta y por lo tanto, como pudo haberse deducido, los animales a los que se les ofreció un suplemento alimenticio concentrado a base de fórmula produjeron más gramos de CH₄ por día que los que consumieron exclusivamente hierba. Según los resultados de las estimaciones de consumo, el grupo con alimento consumió un mayor volumen de materia seca (MS).

Tal parece que existen algunos contrastes entre la producción de CH₄ de este experimento y los estudiados por otros investigadores (Gil, 2005; Beauchemin *et al.*, 2008), los cuales han concluido que la cantidad de CH₄ entérico emitido tienen una relación con el volumen de alimento consumido y la composición de la ración (menores emisiones en dietas bajas en fibra y de alta digestibilidad); en la presente investigación, las emisiones de CH₄ en bovinos que consumieron solo forrajes fueron más bajas que las emisiones de los que consumieron forrajes y alimento concentrado, posiblemente por las diferencias de MS consumida por los animales.

El contenido de fibra y la digestibilidad de los forrajes están negativamente correlacionados. Podría estimarse que el aumento de la digestibilidad de la fibra en este experimento se debe al buen manejo de las pasturas, lo cual promovería bajos niveles de CH₄ en

términos generales. Esto resulta interesante, ya que autores como Galindo *et al.*, 2005, indican que una manipulación de estos factores sería una opción de mitigación efectiva de CH₄ para el ganado en pastoreo. Otros autores (Clark, Kelliher, & Pinares-Patiño, 2011), opinan que existe una débil correlación entre la producción de CH₄ y la edad del pasto consumido.

En cuanto a la edad de los animales, se ha establecido que los rumiantes inmaduros tienden a producir menos emisiones de CH₄ en función de la materia seca ingerida, y estas emisiones van aumentando con la edad (Morrison *et al.*, 2017; Swainson, Hoskin, Clark & López-Villalobos, 2007). Morrison *et al.* (2017), según un estudio realizado en Irlanda del Norte con novillas lecheras de raza Holstein bajo condiciones de pastoreo con *Lolium perenne* L., determinaron que el promedio de emisiones de CH₄ en becerras fue de 98-106 g/día, en novillas añejas fue de 155-189 g/día, y en novillas gestantes fue de 169-172 g/día.

En otro ensayo, realizado por Montenegro-Ballesteros y Barrantes-Guevara (2016) en Costa Rica, con novillas lecheras de raza Jersey consumiendo *Digitaria decumbens* y *Brachiaria brizantha*, se obtuvieron valores de emisión de 141-147 gramos de CH₄ por día (Montenegro-Ballesteros & Barrantes-Guevara, 2016) y con vacas adultas lactantes de raza Holstein, bajo condiciones de pastoreo en Uruguay, se obtuvo un promedio de emisión de CH₄ de 368 g/día (Dini, 2012). Todos estos valores son más altos que los obtenidos en el experimento en cuestión llevado a cabo en el país, debido a que los animales evaluados en esas investigaciones suelen tener mayor peso vivo (PV) que las novillas manejadas en República Dominicana.

De acuerdo a lo discutido en la revisión de literatura, se observa que la producción de CH₄ entérico en bovinos representa un aporte significativo a las emisiones antropogénicas de gases de efecto invernadero, por lo cual es importante el buscar opciones de mitigación para así

reducir la producción de este gas, principalmente en un país como República Dominicana en el que podrían existir más de 2.3 millones de cabezas bovinas. Diversos autores indican que en la producción de CH₄ intervienen diversas rutas metabólicas que implican un gasto de energía para el animal, categorizada en pérdidas de más del diez por ciento de la energía bruta ingerida, dado a que este gas no puede ser aprovechado por el rumiante (Galindo *et al.*, 2005; Johnson *et al.*, 2007). El CH₄ producido entonces es eliminado mayormente por el proceso de eructación, otra fracción a través de la exhalación por los pulmones, y alrededor de 1% en forma de flatulencias por el ano (Johnson *et al.*, 2007; Ramírez-Bribiesca, 2018).

Es preciso hacer notar que de por sí, solo añadir alimentos concentrados a los rumiantes incrementa la producción de gramos de CH₄ entérico en comparación con los tratamientos A (Forraje) y B (Forraje + Concentrado + Monensina), los cuales al promediarse entre sí, indica que se generan valores menores a niveles de 32.88% en comparación con el tratamiento con Forrajes+Alimento Concentrado (C).

Revisando esta situación, en este experimento se decidió incluir un ionóforo (monensina sódica) con fines de incrementar la síntesis de propionato, reduciendo las proporciones de los otros ácidos grasos volátiles, acetato y butirato. Debido a esto, disminuye la producción de hidrógeno y en consecuencia, se reduce la formación de CH₄. Algunos autores opinan que este efecto es dependiente de la dosis del medicamento y que debe de ser administrado continuamente ya que los efectos inhibitorios no suelen ser persistentes (Beauchemin *et al.*, 2008; Galindo *et al.*, 2005; Patra *et al.*, 2017).

También es importante considerar el efecto de defaunación que los ionóforos ejercen sobre los protozoarios ruminales (Beauchemin *et al.*, 2008), ya que esto afecta directamente a los

microorganismos metanogénicos con los que suelen encontrarse en estrechas relaciones simbióticas (McAllister & Newbold, 2008; Patra *et al.*, 2017).

Como se puede observar en los datos analizados, los tratamientos en donde a las novillas se le administró la dieta con monensina resultaron en reducciones significativas de CH₄ entérico en comparación con los animales alimentados con Forraje o con Forraje + Concentrado. Las novillas del primer grupo lograron emitir una media de 12.52 gramos de CH₄ por kg de materia seca consumidos, lo cual equivale a una reducción de un 41.88% y 43.58%, en comparación con valores de 21.54 y 22.19 gramos de CH₄/kgMSI, respectivamente en los otros tratamientos. Este valor es sumamente significativo e indica que, siempre y cuando se pueda reducir CH₄ en esta proporción por el efecto de los ionóforos, se estaría dando un paso importante en la reducción de este gas de efecto invernadero proveniente de la ganadería tanto a nivel nacional como mundial.

Con la finalidad de robustecer la información obtenida en la Tabla 11, se procedió a realizar un comparativo entre las emisiones en gramos/kgMSI, solo de novillas alimentadas a base de forraje (A) y a base de Forraje + Concentrado + Monensina (B). De acuerdo a los datos observados en el análisis de la varianza (ANDEVA) hay diferencias significativas entre los tratamientos, siempre indicando que el tratamiento con monensina, aun consumiendo concentrado, reduce considerablemente (hasta un 43.58%; en promedio 42.75%) las emisiones de CH₄ entérico en novillas. Esto fortalece más la idea de que la monensina es un producto que puede utilizarse efectivamente para reducir las emisiones de CH₄ entérico en rumiantes.

Los resultados de este experimento tienen similitud con las exposiciones hechas por diferentes autores sobre la producción de CH₄ por rumiantes, la cual representa un gasto energético que resulta en una disminución de la productividad. Al reducir las emisiones de CH₄

la energía que normalmente se destinaba a la metanogénesis (de un 2% hasta un 12% de la energía bruta ingerida, dependiendo de la dieta) podrá ser reorientada a la producción de leche o a la ganancia de peso (Johnson, Westberg, Michal & Cossalman, 2007). De esta forma se estarían contemplando beneficios tanto para el animal como para el productor, y al mismo tiempo se reducirán las emisiones de este gas de efecto invernadero (GEI) disminuyendo así la contribución al fenómeno del cambio climático.

De varias opciones que existen, o de los diversos métodos destinados a reducir las emisiones de CH₄ (como la utilización de dietas concentradas con mayor digestibilidad, el uso de leguminosas en el forraje, vacunas anti-metanogénicas, la aplicación de extractos vegetales en el alimento y la adición de otras sustancias a la dieta de los animales) se destacan los antibióticos ionóforos (Beauchemin *et al.*, 2008; Bonilla & Lemus, 2012; Ramírez-Bribiesca, 2018).

Para este caso específico habría que comentar que al agregar concentrado a las raciones de bovinos se incrementa la emisión bruta de CH₄, tomando en consideración el mayor consumo de MS, pero cuando se calcula en base al consumo de materia seca/animal, entonces esta emisión se reduce. Esto contundentemente indica que se ha mejorado la eficiencia del sistema de producción y que los concentrados tienen su rol en generar más producto animal, en reducir la producción de CH₄ (así mitigando el impacto ambiental) y en utilizar menos animales para obtener más beneficios en producción de leche y carne.

CUARTA PARTE

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES

- I- Se ha podido lograr la instalación de la metodología de medición de metano (CH_4) entérico, utilizando la técnica de trazado con hexafluoruro de azufre (SF_6), proveniente de bovinos en la Republica Dominicana. Este tipo de investigación servirá para generar informaciones sobre emisiones nacionales para los inventarios de emisión de gases con efecto invernadero, de acuerdo a lo recomendado por el IPCC.

- II- La confiabilidad de esta técnica de investigación está sustentada en que los resultados de emisión diaria de CH_4 por animal obtenidos en este ensayo son similares a los valores obtenidos en otras investigaciones en las que se usaron animales y alimentos de características similares (edad, peso, etc.) a los evaluados.

- III- De acuerdo al proceso llevado en este experimento, se podría indicar que el país cuenta con la capacidad de evaluar parámetros de emisión de gases con efecto invernadero, para el caso de CH_4 entérico mediante la técnica de trazado con SF_6 , dado que cuenta con un mini-laboratorio de procesamiento de muestras, la implementación de la técnica correspondiente y un cromatógrafo de gas diseñado para el análisis de estos.

- IV- El incremento del consumo de alimento en general en una dieta de forrajes causa incrementos en la producción de CH₄ entérico en función de cantidad de emisiones en gramos de CH₄ entérico por kg de peso vivo (PV), basado en un aumento en el consumo de materia seca (MS). Los datos obtenidos en este experimento indican que al agregar concentrados a la dieta, la emisión se eleva en un 32.88%. A medida que se incrementa el número de animales, se incrementará la producción de CH₄ entérico.
- V- El incremento del consumo de alimento en general en una dieta de forrajes, causa emisiones similares en la producción de CH₄ entérico, en función de calcular las emisiones en gramos de CH₄ entérico por kg de materia seca ingerida (MSI), basado en una mejor eficiencia del uso de alimento. Esto significa que con menos animales se puede producir igual o menos CH₄ entérico, mejorando la producción de leche/carne y reduciendo el impacto ambiental.
- VI- Anteriormente, incluso antes de haberse planteado la relación de las emisiones de CH₄ de origen bovino con el medio ambiente, se conocía que los ionóforos mejoraban la producción de leche y carne por promover más eficiencia en el uso de energía en rumiantes al controlar las pérdidas energéticas en la producción de este gas. En las condiciones de este experimento se pudo determinar que en bovinos, al agregar este antibiótico a un alimento concentrado y comparar la emisión de CH₄ con alimentación basada en solo forrajes y en forrajes más alimentos concentrados, se redujo significativamente la producción de este gas (en función de gramos por kg de MSI) hasta un 43.58%.

VII- Se concluye que para reafirmar estos datos obtenidos se requiere realizar más investigaciones en el área de medición de CH₄ entérico, con la finalidad de ampliar el rango de resultados. Bajo las condiciones en que se condujo el experimento, se pueden profundizar más las investigaciones en esta área, ya que el país cuenta en estos momentos con los requerimientos mínimos para medir la producción de gases con efecto invernadero (como el CH₄ entérico), en razón de que se han preparado las condiciones de laboratorio y se ha desarrollado la capacidad técnica a nivel de campo para las mediciones correspondientes.

CAPÍTULO VI: RECOMENDACIONES

- I- Se puede recomendar el uso de alimentos concentrados en la dieta de rumiantes, en razón de que producen cantidades similares o menores de metano (CH₄) entérico, tomando en consideración la producción por kilogramos de materia seca ingerida (MSI) y no el peso del animal.

- II- Se recomienda el uso de los antibióticos ionóforos en dietas para rumiantes (novillas), en razón de que reducen significativamente las emisiones de CH₄ entérico (tanto en gramos/día como en gramos/kg de MSI/día).

- III- Se recomienda ampliar más las investigaciones para confirmar estos datos preliminares y ampliar el rango de opciones de mitigación en esta área.

QUINTA PARTE

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CAPÍTULO VII: REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A. Lista de Referencias.

- Beauchemin, K. A., M. Kreuzer, F. O'Mara & T. A. McAllister. (2008). Nutritional management for enteric methane abatement: a review. *Aust. J. Exp. Agric.* 48:21-27.
- Berndt, A., T. M., Boland, M. H., Deighton, J. I. Gere, C. Grainger, R. S. Hegarty, A. D. Iwaasa, J. P. Koolaard, K. R. Lassey, D. Luo, R. J. Martin, C. Martin, P. J. Moate, G. Molano, C. Pinares-Patiño, B. E. Ribaux, 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). C. Enteric methane emission by ruminant and its contribution to global climate change. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*. 2012; vol. 3, Num.(2);, pp. 215-246
- Carmona, C. J., Bolívar, M. D., Giraldo, A. L. (2005). El gas metano en la producción ganadera y alternativas para medir sus emisiones y aminorar su impacto a nivel ambiental y productivo. *Rev Col Cienc Pecu* 2005;18:1(49-63).
- Ciganda, V. (2015). Protocolo para Determinación de Emisión de Metano en Rumiantes: “Técnica de Trazador SF₆ para Períodos de Medición Prolongados” Grupo de Medición de GEI en INIA-La Estanzuela, Uruguay. Recuperado de <http://www.researchgate.net/>

publication/280934335_Protocolo_para_Determinacin_de_Emisin_de_Metano_en_Rumi
antes_Tcnica_del_Trazador_SF6_para_Perodos_de_Medicin_Prolongados

Clark, H., Kelliher, F., Pinares-Patiño, C. (2011). Reducing CH₄ Emissions from Grazing Ruminants in New Zealand: Challenges and Opportunities. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. 24. 10.5713/ajas.2011.r.04.

Conferencia de las Partes. (2015). Informe de la Conferencia de las Partes sobre su 21er período de sesiones, celebrado en París del 30 de noviembre al 13 de diciembre de 2015. *Convención Marco sobre el Cambio Climático, Naciones Unidas*. Recuperado de: <https://unfccc.int/resource/docs/2015/cop21/spa/10s.pdf>

Dini, Y. (2012). Emisión de Metano Entérico de Vacas Lecheras en Pastoreo de Praderas Dominadas por Gramíneas o por Leguminosas (tesis de maestría). Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

Fondo Regional de Tecnología Agropecuaria. (2015). “Cambio Climático y Ganadería: Cuantificación y Opciones de Mitigación de las Emisiones de Metano y Óxido Nitroso de Origen Bovino en Condiciones de Pastoreo”, recuperado de <http://www.fontagro.org/proyectos/cambio-clim%C3%A1tico-y-ganader%C3%AD-cuantificaci%C3%B3n-y-opciones-de-mitigaci%C3%B3n-de-las-emisiones-de-me> (revisado en Noviembre 2015).

Francisco. (2015). Carta encíclica. *Laudato si'*. 24 de mayo. 2015. Recuperado de http://w2.vatican.va/content/francesco/es/encyclicals/documents/papa-francesco_20150524_enciclica-laudato-si.html

- Galindo, J., Marrero, Y., González, N. & Sosa, A. (2005). Manipulación de la Fermentación Microbiana Ruminal. Instituto de Ciencia Animal, La Habana, Cuba. Pp. 104.
- García Lagombra, G. (2019). Método reversado de organización de animales por pesada. Comunicacion personal.
- Gere, J. & Gratton, R. (2010). Simple, Low-Cost flow controllers for time averaged atmospheric sampling and other applications. *Latin American Applied Research*. 40: 377-382.
- Gil, S. (2005). Feedlot, Elementos que intervienen y posibles impactos en el medio ambiente. Recuperado de: < http://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/invernada_o_engorde_a_corral_o_feedlot/76-fedlot_impactos_medio_ambiente.pdf>
- Grainger, C., Clarke, T., McGinn, S., Auldist, M., Beauchemin, K., Hannah, M., Waghorn, G., Clark, H. & Eckard, R. (2007). Methane Emissions from Dairy Cows Measured Using the Sulfur Hexafluoride (SF6) Tracer and Chamber Techniques. *Journal of Dairy Science*. 90: 2755-2766.
- Hegarty, R. S. & Lassey, K. R. (2014). Chapter 2: Overview of the SF6 tracer technique and its evolution. Guidelines for use of sulphur hexafluoride (SF6) tracer technique to measure enteric methane emissions from ruminants. pp (16-19). M. G. Lambert, ed. New Zealand Agricultural Greenhouse Gas Research Centre, New Zealand. Recuperado de <http://globalresearchalliance.org/wp-content/uploads/2012/03/SF6-Guidelines-all-chapters-web.pdf>

Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. (2005). Estudio de la Cadena Agroalimentaria de Carne de Res en la República Dominicana. Secretaría de Estado de Agricultura “SEA”, Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura “IICA”, Consejo Nacional de la Competitividad “CNC”. Recuperado de <http://www.iica.int/Esp/regiones/caribe/repDominicana/Documents/Cadenas%20Agroalimentarias/Cadena%20Agroalimentaria%20de%20Carne%20de%20Res.pdf>

IPCC. (2018). Anexo I: Glosario [Matthews J.B.R. (ed.)]. En: Calentamiento global de 1,5 °C, Informe especial del IPCC sobre los impactos del calentamiento global de 1,5 °C con respecto a los niveles preindustriales y las trayectorias correspondientes que deberían seguir las emisiones mundiales de gases de efecto invernadero, en el contexto del reforzamiento de la respuesta mundial a la amenaza del cambio climático, el desarrollo sostenible y los esfuerzos por erradicar la pobreza [Masson-Delmotte V., P. Zhai, H.-O. Pörtner, D. Roberts, J. Skea, P.R. Shukla, A. Pirani, W. Moufouma-Okia, C. Péan, R. Pidcock, S. Connors, J.B.R. Matthews, Y. Chen, X. Zhou, M.I. Gomis, E. Lonnoy, T. Maycock, M. Tignor y T. Waterfield (eds.)].

Inventario Nacional de Gases de Efecto Invernadero de la República Dominicana – Año Base 2010. (2015). Proyecto “Tercera Comunicación Nacional sobre Cambio Climático (TCNCC)”. Recuperado de <https://ccclimatico.files.wordpress.com/2016/01/gases-efecto-invernadero-tcncc-informe-ingei-rd-2015.pdf>

Janssen, P. H. & Kirs, M. (2008). Structure of the Archaeal Community of the Rumen. *Applied and Environmental Microbiology*. P. 3619-3625. Grasslands Research Centre,

- AgResearch Ltd., Palmerston North 4442, New Zealand. Recuperado de <http://aem.asm.org/content/74/12/3619.full.pdf+html>
- Jarrell, K. F., Bayley, D. P., Correia, J. D. & Thomas, N.A. (1999). Recent excitement about Archaea. The Archaea are valuable for studying basic biological questions and have novel biotechnology applications *Bioscience* 1999;49(7):530-541. Recuperado de <http://bioscience.oxfordjournals.org/content/49/7/530.full>
- Johnson, K. & Johnson, D. (1995). Methane emissions from cattle. *Journal Animal Science*. 73: 2483-2492.
- Johnson, K., Westberg, H., Michal, J. & Cossalman, M. (2007). The SF6 tracer technique: methane measurement from ruminants. In: *Measuring Methane Production from Ruminants*. Makkar H, Vercoe P. Recuperado de <http://www.ansci.wsu.edu/People/johnson/Documents/SF6Technique.pdf>
- Kinley, Robert & de Nys, Rocky & Vucko, Matthew & Machado, Lorena & Tomkins, Nigel. (2016). The red macroalgae *Asparagopsis taxiformis* is a potent natural antimethanogenic that reduces methane production during in vitro fermentation with rumen fluid. *Animal Production Science*. 56. 282. 10.1071/AN15576.
- Lassey, K. R. (2014). Chapter 1: Introduction. Guidelines for use of sulphur hexafluoride (SF6) tracer technique to measure enteric methane emissions from ruminants. pp (11-15). M. G. Lambert, ed. New Zealand Agricultural Greenhouse Gas Research Centre, New Zealand. Recuperado de <http://globalresearchalliance.org/wp-content/uploads/2012/03/SF6-Guidelines-all-chapters-web.pdf>

- McAllister, T. A. & Newbold, C. J. (2008). Redirecting rumen fermentation to reduce methanogenesis. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 48, 7-13.
- Montenegro, J. y Abarca, S. (2000). Fijación de carbono, emisión de metano y de óxido nitroso en sistemas de producción bovina en Costa Rica. En: *Intensificación de la ganadería en Centroamérica: beneficios económicos y ambientales*. CATIE – FAO – SIDE. Ed Nuestra Tierra. 334 p.
- Montenegro-Ballester, J. y Barrantes-Guevara, E. (2016). Implementación de la técnica del hexafluoruro de azufre para cuantificar metano entérico en bovinos en Costa Rica. *Revista de Ciencias Ambientales (Tropical Journal of Environmental Sciences)*. (Diciembre, 2016). EISSN: 2215-3896. Vol 50(2): 62-74.
- Morrison, S. J., McBride, J., Gordon, A.W., Wylie, A.R.G. & Yan, T. (2017). Methane Emissions from Grazing Holstein-Friesian Heifers at Different Ages Estimated Using the Sulfur Hexafluoride Tracer Technique. *Engineering*, 3(5), 753–759. <https://doi.org/10.1016/J.ENG.2017.03.018>
- Myhre, G., D. Shindell, F.-M. Bréon, W. Collins, J. Fuglestedt, J. Huang, D. Koch, J.-F. Lamarque, D. Lee, B. Mendoza, T. Nakajima, A. Robock, G. Stephens, T. Takemura and H. Zhang. (2013). Anthropogenic and Natural Radiative Forcing. In: *Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* [Stocker, T.F., D. Qin, G.-K. Plattner, M. Tignor, S.K. Allen, J. Boschung, A. Nauels, Y. Xia, V. Bex and P.M. Midgley (eds.)]. p. 714. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA.

- Patra, A., Park, T., Kim, M. & Yu, Z. (2017). Rumen methanogens and mitigation of methane emission by anti-methanogenic compounds and substances. *Journal of Animal Science and Biotechnology* 8: 13.
- Pinares-Patiño, C., Lassey, K., Martin, R., Molano, G., Fernandez, M., MacLean, S., Sandoval, E., Luo, D. & Clark, H. (2011). Assessment of the sulphur hexafluoride (SF₆) tracer technique using respiration chambers for estimation of methane emissions from sheep. *Animal Feed and Science Technology*. 166: 201-209.
- Pinares-Patiño, C., Gere, J., Williams, K., Gratton, R., Juliarena, P., Molano, G., MacLean, S., Sandoval, E., Taylor, G. & Koolgaard, J. (2012). Extending the Collection Length of Breath Samples for Enteric Methane Emission Estimation Using the SF₆ Tracer Technique. *Animal* 2(2): 275-287.
- Prather, M., Holmes, C. & Hsu, J. (2012). Reactive greenhouse gas scenarios: Systematic exploration of uncertainties and the role of atmospheric chemistry. *Geophysical Research Letters*. 39. 9803-. 10.1029/2012GL051440.
- Ramírez-Bribiesca, J.E. (2018). EVENTOS QUÍMICOS-FISIOLÓGICOS DEL METANO EN LOS RUMIANTES. *Agro productividad. Volumen 11, núm 2, febrero, 2018*. pp: 22-33.
- Secretaría de Estado de Agricultura. (1998). Registro Nacional de Productores Agropecuarios (Tomo I y II). República Dominicana.
- Smith, P., M. Bustamante, H. Ahammad, H. Clark, H. Dong, E. A. Elsiddig, H. Haberl, R. Harper, J. House, M. Jafari, O. Masera, C. Mbow, N. H. Ravindranath, C. W. Rice, C. Robledo Abad, A. Romanovskaya, F. Sperling, & F. Tubiello. (2014). *Agriculture,*

Forestry and Other Land Use (AFOLU). In: Climate Change 2014: Mitigation of Climate Change. Contribution of Working Group III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [Edenhofer, O., R. Pichs-Madruga, Y. Sokona, E. Farahani, S. Kadner, K. Seyboth, A. Adler, I. Baum, S. Brunner, P. Eickemeier, B. Kriemann, J. Savolainen, S. Schlömer, C. von Stechow, T. Zwickel and J.C. Minx (eds.)]. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA.

Swainson, N. M., Hoskin, S. O., Clark, H. & Lopez-Villalobos, N. (2007). The effect of age on methane emissions from young, weaned red deer (*Cervus elaphus*) stags grazing perennial-ryegrass (*Lolium perenne*)-based pasture, New Zealand Journal of Agricultural Research, 50:3, 407-416, DOI: 10.1080/00288230709510308

Woese C.R., Kandler O. & Wheelis, M.L. (1990). Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eukarya. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 87: 4576-4579.

SEXTA PARTE

ANEXOS

CAPÍTULO VIII: ANEXOS

Anexo 1. Hoja de *Microsoft Excel*: Tasas de Permeación (PR) de Tubos de SF₆ “RD2018”.

	A	B	C	D	E	F
1						
2						
3			PR	Vto	R2	
4		2	6.811	Jun-19	0.998	
5		5	5.935	Jun-19	0.998	
6		31	4.954	Jul-19	0.997	
7		50	5.566	May-19	0.996	
8		72	4.404	Aug-19	0.997	
9		73	4.816	Aug-19	0.997	
10		78	4.774	Jul-19	0.999	
11		80	4.413	Mar-19	0.998	
12		95	3.8	Oct-19	0.997	
13		159	7.75	Mar-19	0.998	
14		316	4.314	Apr-19	0.998	
15		A14	5.789	Jul-19	0.998	
16		A08	4.648	May-19	0.999	
17		A53	2.815	Aug-20	0.998	
18		A05	3.982	Jun-19	0.998	
19						
20						

Anexo 2. Lista de Viales Contenedores de Sub-muestras Gaseosas.

Listado de Viales Ensayo A

Listado de Viales Ensayo B

Listado de Viales Ensayo C

A00-1	A21-1	B00-1	B30-1	C03-1	C30-1
A00-2	A21-2	B00-2	B30-2	C03-2	C30-2
A00-3	A21-3	B00-3	B30-3	C03-3	C30-3
A00-4	A21-4	B00-4	B30-4	C03-4	C30-4
A01-1	A26-1	B01-1	B33-1	C07-1	C32-1
A01-2	A26-2	B01-2	B33-2	C07-2	C32-2
A01-3	A26-3	B01-3	B33-3	C07-3	C32-3
A01-4	A26-4	B01-4	B33-4	C07-4	C32-4
A03-1	A29-1	B03-1	B34-1	C08-1	C33-1
A03-2	A29-2	B03-2	B34-2	C08-2	C33-2
A03-3	A29-3	B03-3	B34-3	C08-3	C33-3
A03-4	A29-4	B03-4	B34-4	C08-4	C33-4
A07-1	A30-1	B07-1		C13-1	C34-1
A07-2	A30-2	B07-2		C13-2	C34-2
A07-3	A30-3	B07-3		C13-3	C34-3
A07-4	A30-4	B07-4		C13-4	C34-4
A09-1	A33-1	B10-1		C19-1	C36-1
A09-2	A33-2	B10-2		C19-2	C36-2
A09-3	A33-3	B10-3		C19-3	C36-3
A09-4	A33-4	B10-4		C19-4	C36-4
A13-1	A36-1	B19-1		C26-1	
A13-2	A36-2	B19-2		C26-2	
A13-3	A36-3	B19-3		C26-3	
A13-4	A36-4	B19-4		C26-4	
A19-1		B29-1		C29-1	
A19-2		B29-2		C29-2	
A19-3		B29-3		C29-3	
A19-4		B29-4		C29-4	

Anexo 3. Hoja de Cálculo de *Microsoft Excel* con Todos los Datos Recopilados.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
4	13/05/2019	Evaluación de Emisiones de CH4												
5														
6	Parámetro:	Grupo	Unidad Exp.	Peso Inicial	Peso Final	Consumo MS	Tubo SF6	Tasa Lib. SF6	Sist. Colect.	Presión Inic.	Presión Fin.	Pi. Ajustada	Pf. Ajustada	FC
7	Unidad:	<i>Color Amés</i>	<i>No. I.D.</i>	<i>Kilogramos</i>	<i>Kilogramos</i>	<i>Kg MS/d</i>	<i>No. I.D.</i>	<i>mg/día</i>	<i>No. I.D.</i>	<i>mbar</i>	<i>mbar</i>	<i>mbar</i>	<i>mbar</i>	<i>Factor Correcc.</i>
8	Origen dato:	<i>Método Rev.</i>	<i>Identificación</i>	<i>Pesaje(13/5)</i>	<i>Pesaje (3/6)</i>	<i>2.5% PV (A+2.27)</i>	<i>INIA</i>	<i>INIA</i>	<i>Numerado</i>	<i>Manómetro</i>	<i>Manómetro</i>	<i>(Pi-1015)*-1</i>	<i>(Pf-1015)*-1</i>	<i>Dilución Pf/Pi</i>
9														
10														
11		Control N2	Control N2	Control N2	Control N2	Control N2	Control N2	Control N2	Control N2	Control N2	Control N2	Control N2	Control N2	Control N2
12														
13														
14														
15														
16		Ambiental1	Ambiental1	Ambiental1	Ambiental2	Ambiental1	Ambiental1	Ambiental1	29	725	-409	290	1424	4.9103448
17														
18														
19	Controles													
20														
21		Ambiental2	Ambiental2	Ambiental2	Ambiental3	Ambiental2	Ambiental2	Ambiental2	30	730	-407	285	1422	4.9894737
22														
23														
24														
25														
26		Rojo Control	7933	272	293	6.8	Sin SF6	Sin SF6	13	226	-410	789	1425	1.8060837
27														
28														
29														
30														
31		Rojo	7141	154	170	3.85	A05	3.982	1	662	-410	353	1425	4.0368272
32														
33														
34														
35														
36		Rojo	7141	154	170	3.85	A05	3.982	26	451	-408	564	1423	2.5230496
37														
38														
39	Solo													
40	Pastoreo													
41		Rojo	7938	256	284	6.4	31	4.954	33	588	-408	427	1423	3.3325527
42														
43														
44	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
45														
46		Rojo	7944	333	363	8.325	A08	4.648	7	310	-407	705	1422	2.0170213
47														
48														
49														
50														
51		Azul	7137	198	210	7.22	80	4.413	3	606	-407	409	1422	3.4767726
52														
53														
54														
55														
56		Azul	7137	198	210	7.22	80	4.413	36	213	-405	802	1420	1.7705736
57														
58														
59														
60														
61	Pastoreo y													
62	Alimento	Azul	0.0328	209	222	7.495	72	4.404	9	587	-409	428	1424	3.3271028
63														
64														
65														
66		Azul	7923	286	328	9.42	A14	5.789	19	363	-409	652	1424	2.1840491
67														
68														
69														
70														
71		Azul	7923	286	328	9.42	A14	5.789	21	225	-409	790	1424	1.8025316
72														
73														
74														

	O	P	Q	R	S	T	U	V	W	X	Y	Z	AA	AB	
4															
5															
6	Viales	Conc. CH4	Conc. SF6	Conc. CH4 Aj.	Conc. SF6 Aj.	Prom.C. CH4	Prom.C.SF6	EMISIÓN	Prom. Emis.	Rendimiento	MSProm.	Rendim.	Rend.CH4	PesoPromCH4/peso	Observaciones
7	No. I.D.	[ppm]	[ppt]	[ppm]	[ppt]	[ppm]	[ppt]	(CH4 g/día)	(CH4 g/día)	(CH4 g/cMS/d)	(CH4 g/cMS/d)	(CH4g/Kg)	(CH4g/Kg)		
8	Numerado	Cromatograf.	Cromatograf.	Ajuste con FC	Ajuste conFC	Promedio	Promedio	FÓRMULA	Promedio	Emisión/cMS	Promedio	Emisión/PV	Promedio		
9															
10	A00-1	0.976	1.54	0.976	1.54			N/A		N/A		N/A			
11	A00-2	1.06	1.36	1.06	1.36	0.98125	1.5875	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A		
12	A00-3	1.084	1.99	1.084	1.99			N/A		N/A		N/A			
13	A00-4	0.805	1.46	0.805	1.46			N/A		N/A		N/A			
14															
15	A29-1	1.79	1.41	8.7895172	6.9235862			N/A		N/A		N/A			
16	A29-2	1.24	1.42	6.0888276	6.9726897	8.4335172	6.9849655	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A		
17	A29-3	1.848	1.46	9.0743172	7.1691034			N/A		N/A		N/A			
18	A29-4	1.992	1.4	9.7814069	6.8744828			N/A		N/A		N/A			
19															
20	A30-1	2.248	1.51	11.216337	7.5341053			N/A		N/A		N/A			
21	A30-2	2.236	1.6	11.156463	7.9831579	10.516563	7.347	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A		
22	A30-3	1.99	1.59	9.9290526	7.9332632			N/A		N/A		N/A			
23	A30-4	1.957	1.19	9.7644	5.9374737			N/A		N/A		N/A			
24															
25	A13-1	20.447	7.1	36.928992	12.823194			N/A		N/A		N/A			
26	A13-2	19.739	7.24	35.650285	13.076046	36.215138	12.552281	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A		
27	A13-3	20.074	6.99	36.255323	12.624525			N/A		N/A		N/A			
28	A13-4	19.947	6.47	36.025951	11.685361			N/A		N/A		N/A			
29															
30	A01-1	8.288	26.55	33.457224	107.17776			104.64198	102.62175	27.179735	26.655001	0.6794934	0.666375		
31	A01-2	8.2	26.68	33.101983	107.70255	33.595485	109.82188	102.55382		26.637357		0.6659339			
32	A01-3	8.436	26.96	34.054674	108.83286			105.50288		27.403345		0.6850836			
33	A01-4	8.365	28.63	33.768059	115.57436			97.788329		25.399566		0.6349891			
34															
35	A26-1	14.465	113.32	36.495913	285.91199			42.301825	41.849385	10.987487	10.781561	0.2746872	0.2717493	Emisiones Muy Bajas	
36	A26-2	14.6	112.17	36.836525	283.01048	36.210809	286.00029	43.285628		11.24302		0.2810755		Emisiones Muy Bajas	
37	A26-3	14.132	113.09	35.655738	285.33168			41.072015		10.314419		0.2667014		Emisiones Muy Bajas	
38	A26-4	14.211	114.84	35.855059	289.74702			40.738071		10.581317		0.2645329		Emisiones Muy Bajas	
39															
40	A33-1	29.907	146.66	99.666653	488.75218			101.67525	103.64868	15.886758	16.195107	0.397169			
41	A33-2	29.636	144.27	98.763532	480.78738	100.82638	485.6529	102.34987		15.992167		0.3998042	0.4048777		
42	A33-3	30.84	145.7	102.77593	485.55293			105.88381		16.544346		0.4136086			
43	A33-4	30.637	146.29	102.09942	487.51913			104.6858		16.357157		0.4089289			
44															
45	A07-1	24.72	99.06	49.860766	199.80613			106.78601	109.6767	12.827148	13.174978	0.3206787			
46	A07-2	25.579	98.72	51.593387	199.12034	51.060894	200.30534	111.7652		13.425249		0.3356312	0.3293595		
47	A07-3	25.613	99.5	51.661966	200.69362			111.03711		13.337791		0.3334448			
48	A07-4	25.348	99.95	51.127455	201.60128			109.11849		13.107326		0.3276831			
49															
50	A03-1	9.199	30.81	31.982831	107.11936			108.90215	102.12063	15.0834	14.144131	0.5500108			
51	A03-2	9	30.81	31.290954	107.11936	31.009335	109.24889	105.55455		14.619744		0.5331038	0.5157607		
52	A03-3	8.566	31.28	29.782034	108.75345			96.673307		13.389655		0.488249			
53	A03-4	8.911	32.79	30.981521	114.00337			97.352504		13.483726		0.4916793			
54															
55	A36-1	16.641	34.48	29.464115	61.049377			179.40676	185.78917	24.848582	25.732572	0.9060947		Presión Inicial Muy Baja	
56	A36-2	16.606	33.31	29.402145	58.977805	29.807163	60.115399	186.00147		25.761977		0.9394014	0.9383291	Presión Inicial Muy Baja	
57	A36-3	16.975	33.17	30.055486	58.729925			193.02329		26.734528		0.9748651		Presión Inicial Muy Baja	
58	A36-4	17.117	34.85	30.306908	61.704489			184.72515		25.585201		0.9329553		Presión Inicial Muy Baja	
59															
60	A09-1	8.075	18.98	26.866355	63.148411			149.93227	159.68162	20.004306	21.305086	0.7173793			
61	A09-2	8.423	17.56	28.024187	58.423925	27.300542	61.143832	174.65346		23.302664		0.8356625	0.7640269		
62	A09-3	8.065	18.09	26.833084	60.18729			158.0028		21.081094		0.7559943			
63	A09-4	8.259	18.88	27.478542	62.815701			156.13794		20.832281		0.7470715			
64															
65	A19-1	33.406	138.31	72.960344	302.07583			136.56978	135.12479	14.497853	14.344458	0.4775167			
66	A19-2	33.326	138.58	72.78562	302.66552	72.380479	302.5181	135.92213		14.4291		0.4752522	0.4724643		
67	A19-3	32.74	139.33	71.505767	304.30356			132.44024		14.059474		0.4630778			
68	A19-4	33.09	137.83	72.270184	301.02748			135.56702		14.391403		0.4740106			
69															
70	A21-1	36.532	118.39	65.850086	213.40172			173.41779	171.51046	18.409532	18.207055	0.6063559		Presión Inicial Muy Baja	
71	A21-2	35.829	117.36	64.582906	211.54511	65.160167	213.16739	171.05971		18.159205		0.5981109	0.5996869	Presión Inicial Muy Baja	
72	A21-3	35.892	120.04	64.696466	216.3759			167.45419		17.776454		0.5855042		Presión Inicial Muy Baja	
73	A21-4	36.344	117.25	65.51121	211.34684			174.11016		18.483032		0.6087768		Presión Inicial Muy Baja	

Código de Colores: Verde: Dato de emisión reúne las condiciones de calidad para ser utilizado.
Rojo: Dato de emisión no reúne las condiciones de calidad para ser utilizado.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
79	3/6/2019	Evaluación de Emisiones de CH4 (Repetición)												
80														
81	Parámetro:	Grupo	Animal	Peso Inicial	Peso Final	Consumo MS	Tubo SF6	Tasa Lib. SF6	Sist. Colect.	Presión Inic.	Presión Fin.	Pi. Ajustada	Pf. Ajustada	FC
82	Unidad:	<i>Color Amés</i>	<i>No. I.D.</i>	<i>Kilogramos</i>	<i>Kilogramos</i>	<i>Est. Kg MS/d</i>	<i>No. I.D.</i>	<i>mg/día</i>	<i>No. I.D.</i>	<i>mbar</i>	<i>mbar</i>	<i>mbar</i>	<i>mbar</i>	<i>Factor Correcc.</i>
83	Origen dato:	<i>Método Rev.</i>	<i>Trazabilidad</i>	<i>Pesaje (3/6)</i>	<i>Pesaje(24/6)</i>	<i>2.5% PV (A+2.27)</i>	<i>INIA</i>	<i>INIA</i>	<i>Numerado</i>	<i>Manómetro</i>	<i>Manómetro</i>	<i>(Pi-1023)*-1</i>	<i>(Pf-1023)*-1</i>	<i>Dilución Pf/Pi</i>
84														
85														
86		Control N2	Control N2	Control N2	Control N2	Control N2	Control N2	Control N2	Control N2	Control N2	Control N2	Control N2	Control N2	Control N2
87														
88														
89														
90														
91		Ambiental 1	Ambiental 1	Ambiental 1	Ambiental 2	Ambiental 1	Ambiental 1	Ambiental 1	10	908	-440	115	1463	12.721739
92														
93														
94	Controles													
95														
96		Ambiental2	Ambiental2	Ambiental2	Ambiental3	Ambiental2	Ambiental2	Ambiental2	29	780	-435	243	1458	6
97														
98														
99														
100														
101		Azul Control	7925	353	N/A	11.095	Sin SF6	Sin SF6	33	426	-435	597	1458	2.4422111
102														
103														
104														
105														
106		Rojo	7141	170	195	4.25	A05	3.982	30	739	-437	284	1460	5.1408451
107														
108														
109														
110														
111		Rojo	7938	284	304	7.1	31	4.954	19	342	-437	681	1460	2.143906
112	Solo Pastoreo													
113														
114														
115														
116		Rojo	7944	363	376	9.075	A08	4.648	3	618	-437	405	1460	3.6049383
117														
118														
119														
120														
121		Azul	7137	210	230	7.52	80	4.413	1	670	-438	353	1461	4.1388102
122														
123														
124														
125														
126		Azul	7926	303	323	9.845	316	4.314	34	211	-437	812	1460	1.7980296
127	Pastoreo y Alimento													
128														
129														
130														
131		Azul	7923	328	329	10.47	A14	5.789	7	214	-437	809	1460	1.8046972
132														
133														
134														

	O	P	Q	R	S	T	U	V	W	X	Y	Z	AA	AB	
79															
80															
81	Viales	Conc. CH4	Conc. SF6	Conc. CH4 Aj.	Conc. SF6 Aj.	Prom.C. CH4	Prom.C.SF6	EMISIÓN	Prom. Emis.	Rendimiento	Prom. Rendim.	Rend.CH4	Pescrom	CH4/peso	Observación
82	<i>No. I.D.</i>	<i>[ppm]</i>	<i>[ppt]</i>	<i>[ppm]</i>	<i>[ppt]</i>	<i>[ppm]</i>	<i>[ppt]</i>	<i>(CH4 g/día)</i>	<i>(CH4 g/día)</i>	<i>(CH4 g/cMS/d)</i>	<i>(CH4 g/cMS/g)</i>	<i>(CH4g/Kg)</i>	<i>(CH4g/Kg)</i>		
83	<i>Numerado</i>	<i>Cromatograf.</i>	<i>Cromatograf.</i>	<i>Ajuste con FCA</i>	<i>Ajuste con FC</i>	<i>Promedio</i>	<i>Promedio</i>	<i>FÓRMULA</i>	<i>Promedio</i>	<i>Emisión/cMS</i>	<i>Emisión/cMS</i>	<i>Emisión/PV</i>	<i>Emisión/PV</i>		
84															
85	B00-1	1.165	1.14	N/A	N/A			N/A		N/A		N/A			
86	B00-2	1.067	2.17	N/A	N/A			N/A		N/A		N/A			
87	B00-3	1.219	2.32	N/A	N/A	1.145	1.7525	N/A	N/A	N/A		N/A			
88	B00-4	1.129	1.38	N/A	N/A			N/A		N/A		N/A			
89															
90	B10-1	1.406	0.76	17.886765	9.6685217			N/A		N/A		N/A			
91	B10-2	1.438	0.94	18.293861	11.958435	17.804074	13.8985	N/A	N/A	N/A		N/A			
92	B10-3	1.335	1.57	16.983522	19.97313			N/A		N/A		N/A			
93	B10-4	1.419	1.1	18.052148	13.993913			N/A		N/A		N/A			
94															
95	B29-1	1.927	1.65	11.562	9.9			N/A		N/A		N/A			
96	B29-2	1.709	1.71	10.254	10.26	10.7955	10.545	N/A	N/A	N/A		N/A			
97	B29-3	1.726	1.84	10.356	11.04			N/A		N/A		N/A			
98	B29-4	1.835	1.83	11.01	10.98			N/A		N/A		N/A			
99															
100	B33-1	21.286	8.15	51.984905	19.90402			N/A		N/A		N/A			
101	B33-2	22.405	7.87	54.717739	19.220201	53.699947	19.812437	N/A	N/A	N/A		N/A			
102	B33-3	22.102	8.85	53.977749	21.613568			N/A		N/A		N/A			
103	B33-4	22.16	7.58	54.119397	18.51196			N/A		N/A		N/A			
104															
105	B30-1	7.837	22.85	40.288803	117.46831			107.75819	25.354869	22.696172	22.840215	0.6338717			
106	B30-2	8.306	27.37	42.699859	140.70493	42.201197	138.48151	96.458733	97.070914	21.538359	21.771459	0.5674043	0.5710054		
107	B30-3	8.364	28.99	42.998028	149.0331			91.538025		21.538359		0.538459			
108	B30-4	8.329	28.54	42.818099	146.71972			92.528702		21.771459		0.5442865			
109															
110	B19-1	25.298	114.92	54.236535	246.37768			92.595666	93.370702	13.041643	13.150803	0.3260411			
111	B19-2	23.877	106.06	51.190044	227.38267	52.877834	236.56931	93.083223		13.110313		0.3277578	0.3287701		
112	B19-3	24.535	108.05	52.600734	231.64905			94.763697		13.347		0.333675			
113	B19-4	24.947	112.35	53.484023	240.86784			93.040222		13.104257		0.3276064			
114															
115	B03-1	8.687	29.03	31.316099	104.65136			93.775107	92.989952	10.333345	10.246827	0.2583336			
116	B03-2	8.83	28.83	31.831605	103.93037	31.957778	109.11247	97.375576		10.730091		0.2682523	0.2561707		
117	B03-3	8.727	31.88	31.460296	114.92543			85.109376		9.3784436		0.2344611			
118	B03-4	9.216	31.33	33.223111	112.94272			95.699748		10.545427		0.2636357			
119															
120	B01-1	8.254	20.34	34.161739	84.183399			133.48175		17.750232		0.6356274			
121	B01-2	8.636	18.6	35.742765	76.98187	34.450421	82.351976	160.13214	139.63308	21.294168	18.568228	0.762534	0.6649194		
122	B01-3	8.342	19.72	34.525955	81.617337			140.95575		18.744116		0.6712179			
123	B01-4	8.063	20.93	33.371227	86.625297			123.96266		16.484396		0.5902984			
124															
125	B34-1	21.095	90.39	37.929433	162.52389			74.325754		7.5495941		0.2452995		Presión Inicial Muy Baja	
126	B34-2	20.939	90.02	37.648941	161.85862	37.926736	165.10406	73.770003	72.497687	7.493144	7.3639093	0.2434654	0.2392663	Presión Inicial Muy Baja	
127	B34-3	21.113	93.7	37.961798	168.47537			69.255802		7.0346167		0.228567		Presión Inicial Muy Baja	
128	B34-4	21.227	93.19	38.166773	167.55837			72.63919		7.3782823		0.2397333		Presión Inicial Muy Baja	
129															
130	B07-1	26.637	118.88	48.071718	214.5424			105.89766		10.11439		0.3228587			
131	B07-2	26.318	117.34	47.49602	211.76316	47.182905	211.00068	105.54227	104.93789	10.080446	10.022721	0.3217752	0.3199326		
132	B07-3	25.5	115.62	46.019778	208.65909			102.44239		9.7843732		0.3123244			
133	B07-4	26.123	115.83	47.144104	209.03807			105.86924		10.111675		0.3227721			
134															

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
154	24/6/2019	Experimento Monensina												
155														
156	Parámetro:	Grupo	Animal	Peso Inicial	Peso Final	Consumo MS	Tubo SF6	Tasa Lib. SF6	Sist. Colect.	Presión Inic.	Presión Fin.	Pi. Ajustada	Pf. Ajustada	FC
157	Unidad:	<i>Cinta</i>	<i>No. I.D.</i>	<i>Kilogramos</i>	<i>Kilogramos</i>	<i>Est. Kg MS/d</i>	<i>No. I.D.</i>	<i>mg/día</i>	<i>No. I.D.</i>	<i>mbar</i>	<i>mbar</i>	<i>mbar</i>	<i>mbar</i>	<i>Factor Correcc.</i>
158	Origen dato:	<i>Método Rev.</i>	<i>Trazabilidad</i>	<i>Pesaje(24/6)</i>	<i>Pesaje</i>	<i>2.5% PV (A+2.27)</i>	<i>INIA</i>	<i>INIA</i>	<i>Numerado</i>	<i>Manómetro</i>	<i>Manómetro</i>	<i>(Pi-1024)*-1</i>	<i>(Pf-1024)*-1</i>	<i>Dilución Pf/Pi</i>
159														
160														
161	Control	Ambiental1	Ambiental1	Ambiental1	Ambiental2	Ambiental1	Ambiental1	Ambiental1	29	828	-413	196	1437	7.3316327
162														
163														
164														
165														
166		Sin Cinta	7139	225	N/A	5.625	78	4.774	32	221	-413	803	1437	1.7895392
167														
168														
169														
170														
171		Sin Cinta	7137	230	N/A	5.75	80	4.413	13	669	-414	355	1438	4.0507042
172														
173														
174														
175														
176		Sin Cinta	7933	311	N/A	7.775	159	7.75	33	323	-412	701	1436	2.0485021
177														
178														
179	Solo Pastoreo													
180														
181		Sin Cinta	7926	323	N/A	8.075	316	4.314	3	617	-413	407	1437	3.5307125
182														
183														
184														
185														
186		Sin Cinta	7926	323	N/A	8.075	316	4.314	8	211	-416	813	1440	1.7712177
187														
188														
189														
190														
191		Sin Cinta	7944	376	N/A	9.4	A08	4.648	26	216	-413	808	1437	1.7784653
192														
193														
194														
194														
195														
196		Con Cinta	7141	195	N/A	7.145	A05	3.982	30	738	-413	286	1437	5.0244755
197														
198														
199														
200														
201		Con Cinta	7141	195	N/A	7.145	A05	3.982	7	224	-412	800	1436	1.795
202														
203														
204														
205	Pastoreo y Alimento + Monensina													
206		Con Cinta	0.0328	242	N/A	8.32	72	4.404	19	283	-412	741	1436	1.9379217
207														
208														
209														
210														
211		Con Cinta	7923	329	N/A	10.495	A14	5.789	34	222	-413	802	1437	1.7917706
212														
213														
214														
215														
216		Con Cinta	7941	350	N/A	11.02	2	6.811	36	555	-413	469	1437	3.0639659
217														
218														

	O	P	Q	R	S	T	U	V	W	X	Y	Z	AA	AB
154														
155														
156	Viales	Conc. CH4	Conc. SF6	Conc. CH4 Aj.	Conc. SF6 Aj.	Prom.C. CH4	Prom.C.SF6	EMISIÓN	Prom. Emis.	Rendimiento	MSProm.	Rend.Ch4	Pes'rom	Observación
157	No. I.D.	[ppm]	[ppt]	[ppm]	[ppt]	[ppm]	[ppt]	(CH4 g/día)	(CH4 g/día)	(CH4 g/cMS/a)	(CH4 g/cMS/d)	(CH4g/Kg)	(CH4g/Kg)	
158	Numerado	Cromatograf.	Cromatograf.	Ajuste con FC	Ajuste con FC	Promedio	Promedio	FÓRMULA	Promedio	Emisión/cMS	Emisión/cMS	Emisión/PV	Emisión/PV	
159														
160	C29-1	1.466	3.09	10.748173	22.654745			N/A		N/A		N/A		
161	C29-2	1.537	2.98	11.268719	21.848265			N/A		N/A		N/A		
162	C29-3	1.524	2.26	11.173408	16.56949	10.944295	20.95014	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
163	C29-4	1.444	3.1	10.586878	22.728061			N/A		N/A		N/A		
164														
165	C32-1	8.799	81.76	15.746156	146.31273			20.039698		3.5626131		0.0890653		Presión Inicial Muy Baja
166	C32-2	8.457	79.69	15.134133	142.60838			18.017947		3.2031906		0.0800798		Presión Inicial Muy Baja
167	C32-3	9.034	82.8	16.166697	148.17385	15.481304	146.34852	21.475924	18.923763	3.817942	3.3642245	0.0954486	0.0841056	Presión Inicial Muy Baja
168	C32-4	8.314	82.87	14.878229	148.29912			16.161483		2.8731525		0.0718288		Presión Inicial Muy Baja
169														
170	C13-1	17.173	26.73	69.562744	108.27532			324.6354		56.45833		1.4114582		Emisiones Muy Elevadas
171	C13-2	16.861	26.71	68.298924	108.19431			317.93118		55.292379		1.3823095		Emisiones Muy Elevadas
172	C13-3	17.076	25.5	69.166825	103.29296	68.749565	104.974	341.97061	333.20132	59.47315	57.948055	1.4868288	1.4487014	Emisiones Muy Elevadas
173	C13-4	16.779	24.72	67.966766	100.13341			348.26808		60.568361		1.514209		Emisiones Muy Elevadas
174														
175	C33-1	25.044	10.31	51.302688	21.120057			201728.14		25945.742		648.64354		SF6 No Estabilizado
176	C33-2	24.618	11.36	50.430026	23.270984			14449.841		1858.5004		46.462511		SF6 No Estabilizado
177	C33-3	24.209	15.83	49.592188	32.427789	50.662531	27.265563	2859.84	55518.671	367.82508	7140.6651	9.195627	178.51663	SF6 No Estabilizado
178	C33-4	25.055	15.74	51.325221	32.243424			3036.8608		390.59303		9.7648257		SF6 No Estabilizado
179														
180	C03-1	5.317	13.54	18.772799	47.805848			137.81276		17.066596		0.4266649		
181	C03-2	5.698	11.92	20.118	42.086093			205.19663		25.411347		0.6352837		
182	C03-3	5.023	9.51	17.734769	33.577076	19.215903	42.642181	254.24324	191.31939	31.485231	23.692804	0.7871308	0.5923201	
183	C03-4	5.732	13.34	20.238044	47.099705			168.02495		20.808043		0.5202011		
184														
185	C08-1	17.298	98.49	30.638524	174.44723			60.657723		7.5117924		0.1877948		Presión Inicial Muy Baja
186	C08-2	17.502	99.71	30.999852	176.60812			60.91309		7.5434167		0.1885854		Presión Inicial Muy Baja
187	C08-3	17.679	98.67	31.313358	174.76605	31.052103	174.50037	62.606159	61.919122	7.7530847	7.6680027	0.1938271	0.1917001	Presión Inicial Muy Baja
188	C08-4	17.647	97.21	31.256679	172.18007			63.499515		7.8637171		0.1965929		Presión Inicial Muy Baja
189														
190	C26-1	51.836	317.22	92.18853	564.16478			76.182345		8.1045048		0.2026126		Presión Inicial Muy Baja
191	C26-2	52.472	318.74	93.319634	566.86804			76.860485		8.1766474		0.2044162		Presión Inicial Muy Baja
192	C26-3	52.476	318.03	93.326748	565.60533	92.628255	564.50713	77.045529	76.54513	8.1963116	8.1430989	0.2049078	0.2035775	Presión Inicial Muy Baja
193	C26-4	51.549	315.66	91.67811	561.39037			76.09236		8.0949319		0.2023733		Presión Inicial Muy Baja
194														
194														
195	C30-1	6.92	33.31	34.769371	167.36528			71.009539		9.9383539		0.3641515		
196	C30-2	7.256	37.91	36.457594	190.47787			65.674122		9.1916196		0.3367904		
197	C30-3	6.94	34.4	34.86986	172.84196	36.285506	176.39677	68.737893	71.268713	9.6204189	9.9746274	0.352502	0.3654806	
198	C30-4	7.771	34.81	39.045199	174.90199			79.653298		11.148117		0.4084785		
199														
200	C07-1	9.894	93.79	17.75973	168.35305			20.176969		2.8239285		0.1034716		Presión Inicial Muy Baja
201	C07-2	9.442	93.08	16.94839	167.0786			17.930036		2.5094522		0.0919489		Presión Inicial Muy Baja
202	C07-3	9.702	95.69	17.41509	171.76355	17.328033	169.81149	18.723459	18.716287	2.6204981	2.6194944	0.0960177	0.095981	Presión Inicial Muy Baja
203	C07-4	9.576	95.85	17.18892	172.05075			18.034685		2.5240986		0.0924856		Presión Inicial Muy Baja
204														
205	C19-1	13.17	74.09	25.522429	143.58062			57.374374		6.8959584		0.2370842		
206	C19-2	13.827	73.49	26.795644	142.41787			62.982481		7.5700097		0.2602582		
207	C19-3	14.16	73	27.440972	141.46829	26.611541	143.56609	66.063027	61.698568	7.9402676	7.4156933	0.2729877	0.2549528	
208	C19-4	13.771	75.75	26.68712	146.79757			60.374391		7.2565374		0.249481		
209														
210	C34-1	27.945	155.15	50.071029	277.9932			96.569145		9.201443		0.2935232		
211	C34-2	26.659	144.98	47.766812	259.7709			97.816491		9.3202945		0.2973146		
212	C34-3	27.175	147.19	48.691365	263.73071	48.65777	267.05892	98.637034	97.232541	9.3984787	9.2646538	0.2998086	0.2955396	
213	C34-4	26.846	148.87	48.101873	266.74089			95.907496		9.1383988		0.2915121		
214														
215	C36-1	17.943	77.25	54.97674	236.69136			152.34131		13.824075		0.4352609		
216	C36-2	17.51	74.49	53.650043	228.23482			153.77904		13.954541		0.4393687		
217	C36-3	17.738	77.06	54.348627	236.10921	54.444376	234.70745	150.5745	151.91502	13.663748	13.785392	0.4302129	0.4340429	
218	C36-4	17.886	77.61	54.802094	237.79439			150.96523		13.699204		0.4313292		
219														
220														

Anexo 4. Hojas de Cálculo de *Microsoft Excel* con los Datos de Pastoreo y Consumo.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	
1	Datos de Pastoreo															
2	Animales					Potreros					Alimentación Suplementaria					
3		Identificación	Peso (Kg.)	Grupo	Recipiente C.		Área de los 5 Potreros (m ²):					Hierba Merker Ofrecida Diariamente (Kg.):				
4	1	7137	198	Azul	03 y 36		8,946					42				
5	2	7141	154	Rojo	01 y 26											
6	3	328	209	Azul	22 y 09		Área Estimada de 1 Potrero (m ²):					Porcentaje de Materia Seca de Hierba Merker (%):				
7	4	7941	323	Azul	06 y 08		1789.2					11.62				
8	5	7936	318	Rojo	38 y 02											
9	6	7139	186	Rojo	05 y 31		Tiempo Diario de Pastoreo (horas):					Concentrado Ofrecido Diariamente al Grupo A de 7 Animales(Kg.):				
10	7	321	267	Rojo	16 y 24		6					15.9				
11	8	7928	391	Azul	18 y 37											
12	9	7944	333	Rojo	12 y 07		Porcentaje de Materia Seca de Hierba en Potreros:					Porcentaje de Materia Seca de Alimento de Fórmula:				
13	10	7933	272	Rojo	13 y 14		32.85					86.68				
14	11	7926	277	Azul	23 y 40											
15	12	7925	319	Azul	27 y 11		Consumo Estimado de Hierba en Potreros (Kg/día):									
16	13	7923	286	Azul	19 y 21		Potrero 4: 162.7 Potrero 5: 276.5									
17	14	7938	256	Rojo	32 y 33											
18	Promedio: 270.642857						Consumo Estimado de MS en Potreros (Kg/día):									
19							Potrero 4: 53.44695 Potrero 5: 90.83025									
20				Ambiente:		29 y 30										
21																

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P
1	CH4 Consumo de Pasturas 104			*Área de corte: 1/2 metro cuadrado.												
2																
3	Mediciones en el Potrero 4								Mediciones en el Potrero 5							
4																
5	Lunes 13/05/2019 (Antes del pastoreo)								Martes 14/05/2019 (Antes del pastoreo)							
6	Proporción de altura: 40%Bajo, 50%Mediano y 10% Alto.								Proporción de altura: 30%Bajo, 60%Mediano y 10%Alto.							
7	Muestreo	Altura	Altura (cm.)	Peso (lb.)					Muestreo	Altura	Altura (cm.)	Peso (lb.)				
8	1	Bajo	25	1.0					1	Bajo	25	1.2				
9	2	Bajo	25	1.0	Promedio Altura (cm.)				2	Bajo	20	0.8	Promedio Altura (cm.)			
10	3	Mediano	50	2.4	41.5				3	Mediano	50	2.4	40.5			
11	4	Mediano	55	3.0					4	Alto	70	3.0				
12	5	Mediano	45	2.4	Promedio Peso (lb.)				5	Mediano	40	1.6	Promedio Peso (lb.)			
13	6	Mediano	55	3.4	2.02				6	Mediano	50	2.2	1.72			
14	7	Mediano	45	2.6					7	Mediano	45	1.8				
15	8	Bajo	25	0.8					8	Bajo	20	1.0				
16	9	Alto	65	2.6					9	Mediano	40	1.4				
17	10	Bajo	25	1.0					10	Mediano	45	1.8				
18																
19	Miércoles 15/05/2019 (Después del pastoreo)								Viernes 17/05/2019 (Después del pastoreo)							
20	Proporción de altura: 60%Bajo, 40%Mediano.								Proporción de altura: 70%Bajo, 30%Mediano.							
21	Muestreo	Altura	Altura (cm.)	Peso (lb.)					Muestreo	Altura	Altura (cm.)	Peso (lb.)				
22	1	Bajo	20	1.2					1	Bajo	20	1.2				
23	2	Bajo	15	1.2	Promedio Altura (cm.)				2	Bajo	10	0.4	Promedio Altura (cm.)			
24	3	Bajo	10	1.4	26				3	Bajo	30	2.4	26			
25	4	Mediano	30	1.2					4	Bajo	25	1.4				
26	5	Mediano	40	2.4	Promedio Peso (lb.)				5	Bajo	25	1.2	Promedio Peso (lb.)			
27	6	Bajo	25	2.4	1.82				6	Mediano	35	2.2	1.38			
28	7	Bajo	20	1.6					7	Mediano	35	1.2				
29	8	Mediano	35	2.6	Consumo Estimado:				8	Bajo	25	1.4	Consumo Estimado:			
30	9	Mediano	40	2.4	0.2 lb por 1/2m ²				9	Bajo	15	0.6	0.34 lb por 1/2m ²			
31	10	Bajo	25	1.8	0.4 lb por 1m ²				10	Mediano	40	1.8	0.68 lb por 1m ²			
32					0.1818182 kg por 1m ²								0.3090909 kg por 1m ²			
33					325.30909 kg por 1,789.2 m ²								553.02545 kg por 1,789.2 m ²			
34					162.65455 kg por día								276.51273 kg por día			
35																

Anexo 5. Formulación de Alimento Concentrado.

DR. GREGORIO GARCIA LAGOMBRA, Ph.D. CEL (809) 696-6813

CFC/Concept5

Date: 03/05/19

Plant: 3 ALIMENTOS LECHEROS
 Product: 4170 NOVILLAS EXP METANO ENMANUEL

Time: 10:26:29

User: PRO5USER

Page: 1

Batch: 100,00 Nutr Class: 0 Ingr Costs: Owning Status: FEASIBLE

INGREDIENT SOLUTION: (Unrounded)

IngrCode	Ingredient Name	Amount Lbs
202	MAIZ MOLIDO FINO	30,59
427	ARROZ PASTA	25,00
577	GALLINAZA POLLOS	24,23
305	MELAZA DE CANA	10,00
400	TORTA DE COCO	8,497
970	FOSFATO MONODICA	0,7419
961	SAL	0,4000
1048	PREM VI/MI LECHE	0,2500
862	UREA ENTERA	0,2216
950	CARBONATO CALCIO	0,0756

NUTRIENT SOLUTION:

No	Nutrient Name	Units	Analysis	Minimum	Maximum	Incr	R-Cost
3	HUMEDAD	PCT	12,336		13,000		
6	PROTEINA CRUDA	PCT	14,000	14,000		0,10	13,641
12	GRASA CRUDA		6,064	3,000	12,000		
16	FIBRA CRUDA	PCT	10,000		10,000	0,10	-21,185
18	CALCIO	%	0,900	0,900	1,050	1,00	304,911
20	FOSFORO TOTAL	%	0,959				
22	FOSFORO DIG	PCT	0,380	0,380		1,00	1949,62
46	E.N. LACTACION	KCAL/KG	1502,615				
48	E.N. MANT. LECHE	KCAL/KG	1566,665				
50	E.N. GAN LECHE	KCAL/KG	1155,676				
58	NDT RUMIANTES L	%	68,000	68,000		1,00	218,837
126	SODIO	%	0,171		0,700		
128	POTASIO	%	0,438		1,400		
132	MAGNESIO	%	0,162		1,000		
134	AZUFRE	%	0,075				
176	FIBRA NEUTRO DET	%	17,328				
178	FIBRA ACIDO DET	%	8,551				
180	BRANS (AFRECHO)	%	0,000		35,000		
188	FACTOR FORRAJERO	%	0,000				

*PARA LA FASE III, MONENSINA SÓDICA: 0.013 Lbs

Anexo 6. Informe de Resultados de Cromatografía Gaseosa.



LABORATORIO DE MEDIO AMBIENTE INFORME DE RESULTADOS

Atención a:	Gregorio García	Fecha de Emisión:	06-12-2019
--------------------	-----------------	--------------------------	------------

Antecedentes de la(s) muestra(s):	Muestras gaseosas, contenidas en viales de vidrio de 22 ml para análisis de GEI.
Observaciones generales:	Recepción de 140 muestras en total

ID Muestra	Área CH ₄ [μV·s]	CH ₄ [ppm]	Área SF ₆ [μV·s]	SF ₆ [ppt]	Observaciones (Recepción-Análisis)
A00-1	522.01	0.976	1849.01	1.54	
A00-2	770.24	1.060	1631.28	1.36	
A00-3	843.63	1.084	2383.24	1.99	
A00-4	10.77	0.805	1755.3	1.46	
A01-1	22320.88	8.288	17450.61	26.55	
A01-2	22194.83	8.20	17538.33	26.68	
A01-3	22744.38	8.436	17717.91	26.96	
A01-4	22471.30	8.365	18344.2	28.63	
A03-1	25048.62	9.199	19157.06	30.81	
A03-2	24454.89	9.000	19156.9	30.81	
A03-3	23159.83	8.566	19333.58	31.28	
A03-4	24189.07	8.911	19899.56	32.79	
A07-1	71332.36	24.72	44677.63	99.06	
A07-2	73909.33	25.579	44523.05	98.72	
A07-3	74011.97	25.613	44841.52	99.50	
A07-4	73219.56	25.348	45011.84	99.95	
A09-1	21696.46	8.075	14733.83	18.98	
A09-2	22734.67	8.423	14204.71	17.56	
A09-3	21666.73	8.065	14633.08	18.09	
A09-4	22244.25	8.259	14696.87	18.88	
A10-3	1591.28	1.335	1886.18	1.57	
A10-4	1841.91	1.419	1317.45	1.10	
A13-1	58600.45	20.447	8509.11	7.10	

ID Muestra	Área CH ₄ [μV·s]	CH ₄ [ppm]	Área SF ₆ [μV·s]	SF ₆ [ppt]	Observaciones (Recepción- Análisis)
A13-2	56488.51	19.739	8677.16	7.24	
A13-3	57448.21	20.074	8383.65	6.99	
A13-4	57083.50	19.947	7762.9	6.47	
A19-1	97256.00	33.406	59355.74	138.31	
A19-2	97019.42	33.326	59469.17	138.58	
A19-3	95257.08	32.74	59735.73	139.33	
A19-4	96314.09	33.090	59173.32	137.83	
A21-1	106569.34	36.532	51972.14	118.39	
A21-2	104518.26	35.829	51520.26	117.36	
A21-3	104703.91	35.892	52521.82	120.04	
A21-4	106021.89	36.344	51301.72	117.25	
A26-1	40758.40	14.465	50011.58	113.32	
A26-2	41147.92	14.60	49503.25	112.17	
A26-3	39763.81	14.132	49908.87	113.09	
A26-4	40000.62	14.211	50578.68	114.84	
A29-1	2949.55	1.790	1692.92	1.41	
A29-2	1309.26	1.240	1699.15	1.42	
A29-3	3121.03	1.848	1750.04	1.46	
A29-4	3549.95	1.992	1678.97	1.40	
A30-1	4315.18	2.248	1806.19	1.51	
A30-2	4277.96	2.236	1917.47	1.60	
A30-3	3546.41	1.990	1902.33	1.59	
A30-4	3448.21	1.957	1427.39	1.19	
A33-1	86818.58	29.907	62475.63	146.66	
A33-2	86011.11	29.636	61581.82	144.27	
A33-3	89604.51	30.840	62194.83	145.70	
A33-4	88996.87	30.637	62447.56	146.29	
A36-1	47422.94	16.641	20800.68	34.48	
A36-2	47267.32	16.606	20092.93	33.31	
A36-3	48347.52	16.975	19671.6	33.17	
A36-4	48772.29	17.117	20667.64	34.85	
B00-1	1085.31	1.165	1364.91	1.14	
B00-2	792.62	1.067	2607.18	2.17	
B00-3	1246.36	1.219	2781.2	2.32	
B00-4	977.50	1.129	1654.97	1.38	
B01-1	22228.94	8.254	15243.04	20.34	

LABORATORIO DE MEDIO AMBIENTE
INFORME DE RESULTADOS

ID Muestra	Área CH ₄ [μV·s]	CH ₄ [ppm]	Área SF ₆ [μV·s]	SF ₆ [ppt]	Observaciones (Recepción- Análisis)
B01-2	23370.40	8.636	14592.62	18.60	
B01-3	22491.58	8.342	15012.55	19.72	
B01-4	21660.19	8.063	15465.84	20.93	
B03-1	23522.11	8.687	18491.2	29.03	
B03-2	23948.12	8.830	18416.9	28.83	
B03-3	23640.48	8.727	19559.13	31.88	
B03-4	25101.08	9.216	19353.66	31.33	
B07-1	77066.06	26.637	52091.16	118.88	
B07-2	76113.43	26.318	51514.94	117.34	
B07-3	73672.91	25.500	50660.08	115.62	
B07-4	75532.43	26.123	50950.15	115.83	
B10-1	1804.67	1.406	906.02	0.76	
B10-2	1899.79	1.438	1121.56	0.94	
B19-1	73071.63	25.298	50609.37	114.92	
B19-2	68832.56	23.877	47296.97	106.06	
B19-3	70797.06	24.535	48039.46	108.05	
B19-4	72023.32	24.947	49648.12	112.35	
B29-1	3053.05	1.927	1977.37	1.65	
B29-2	2707.43	1.709	2046	1.71	
B29-3	2757.47	1.726	2201.46	1.84	
B29-4	3082.49	1.835	2195.25	1.83	
B30-1	20986.66	7.837	16183.38	22.85	
B30-2	22386.53	8.306	17872.52	27.37	
B30-3	22558.48	8.364	18477.38	28.99	
B30-4	22455.56	8.329	18309	28.54	
B33-1	61103.53	21.286	9778.32	8.15	
B33-2	64440.84	22.405	9436.82	7.87	
B33-3	63539.60	22.102	10611.53	8.85	
B33-4	63710.37	22.160	9088.77	7.58	
B34-1	60535.75	21.095	41435.61	90.39	
B34-2	60069.81	20.939	41296.72	90.02	
B34-3	60589.10	21.113	42673.95	93.70	
B34-4	60929.56	21.227	42483.93	93.19	
C03-1	13469.56	5.317	12702.44	13.54	
C03-2	14606.71	5.698	12096.52	11.92	

LABORATORIO DE MEDIO AMBIENTE
INFORME DE RESULTADOS

ID Muestra	Área CH ₄ [μV·s]	CH ₄ [ppm]	Área SF ₆ [μV·s]	SF ₆ [ppt]	Observaciones (Recepción- Análisis)
C03-3	12593.39	5.023	11194.06	9.51	
C03-4	14706.93	5.732	12624.97	13.34	
C07-1	27123.09	9.894	42765.74	93.79	
C07-2	25774.31	9.442	42443.74	93.08	
C07-3	26549.26	9.702	43416.92	95.69	
C07-4	26172.36	9.576	43478.56	95.85	
C08-1	49235.66	17.298	44675.74	98.49	
C08-2	49815.72	17.502	44921.59	99.71	
C08-3	50345.58	17.679	44532.94	98.67	
C08-4	50248.39	17.647	43984.75	97.21	
C13-1	48835.21	17.173	17631.47	26.73	
C13-2	47947.80	16.861	17623.66	26.71	
C13-3	48558.87	17.076	16828.54	25.50	
C13-4	47713.82	16.779	16311.93	24.72	
C19-1	36894.78	13.170	35340.54	74.09	
C19-2	38853.84	13.827	35115.45	73.49	
C19-3	39846.87	14.160	34933.49	73.00	
C19-4	38686.74	13.771	35962.73	75.75	
C26-1	152262.12	51.836	126233.47	317.22	
C26-2	154129.62	52.472	126837.21	318.74	
C26-3	154142.01	52.476	126553.38	318.03	
C26-4	151375.72	51.549	125610.57	315.66	
C29-1	1982.07	1.466	3710.28	3.09	
C29-2	2193.24	1.537	3569.53	2.98	
C29-3	2154.29	1.524	2715.57	2.26	
C29-4	1916.77	1.444	3714.5	3.10	
C30-1	18251.58	6.920	20094.46	33.31	
C30-2	19254.89	7.256	21812.01	37.91	
C30-3	18323.24	6.94	20501.43	34.40	
C30-4	20789.51	7.771	20745.93	34.81	
C32-1	23856.18	8.799	38211.29	81.76	
C32-2	22835.37	8.457	37436.68	79.69	
C32-3	24556.51	9.034	38596.94	82.80	
C32-4	22410.57	8.314	38625.06	82.87	
C33-1	72314.04	25.044	11493.35	10.31	
C33-2	71043.42	24.618	11884.24	11.36	

Anexo 7. Resultados de Análisis de Laboratorio de Alimento, Pasto y Heces Bovinas.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1	Resultados de Análisis de Alimento, Pasto, y Heces Bovinas									
2										
3	<i>Fecha: 13/05/2019</i>									
4	Resultados (%p/p)									
5	Id. Muestra	Cenizas	Carbohidratos	Grasas	Humedad	Materia Seca	Proteínas	Fibra Cruda	FAD	FND
6	Alimento 1	\	\	\	\	\	\	\	13.37	19.85
7	Alimento 2	\	\	\	\	\	\	\	11.10	21.10
8	Alimento 3	9.39	62.47	4.43	13.26	86.74	10.45	13.01	\	\
9	Alimento 4	10.73	60.79	4.58	13.39	86.61	10.51	11.79	\	\
10	Pasto P4-01	\	\	\	\	\	\	\	44.48	66.33
11	Pasto P4-02	\	\	\	\	\	\	\	44.39	65.73
12	Pasto P4-03	9.00	84.10	1.52	71.74	28.26	5.34	31.61	\	\
13	Pasto P4-04	9.76	83.10	1.72	62.56	37.44	5.43	32.46	\	\
14	Hierba Merker	11.39	83.00	1.55	88.38	11.62	4.05	41.50	43.27	68.03
15	Hece A-0328	4.35	13.43	0.15	80.00	20.00	2.07	6.05	2.78	3.48
16	Hece A-7926	2.99	16.48	0.02	78.99	21.01	1.52	1.94	1.70	2.28
17	Hece A-7928	2.24	11.11	\	84.74	15.26	1.91	2.30	2.99	5.71
18	Hece R-0321	2.30	15.58	0.20	76.64	23.36	5.28	7.46	2.34	3.61
19	Hece R-7933	1.91	10.21	0.12	86.81	13.19	0.95	4.24	1.49	4.69
20	Hece R-7944	\	\	\	\	\	\	\	1.48	3.51
21										
22	<i>Fecha: 17/05/2019</i>									
23	Resultados (%p/p)									
24	Id. Muestra	Cenizas	Carbohidratos	Grasas	Humedad	Materia Seca	Proteínas	Fibra Cruda	FAD	FND
25	Hece A-0328	2.94	9.05	\	86.01	13.99	2.00	4.31	3.84	4.99
26	Hece A-7926	3.11	12.33	\	82.81	17.19	1.75	5.15	\	\
27	Hece A-7928	3.30	\	\	81.87	18.13	1.06	\	2.77	4.93
28	Hece R-0321	2.16	10.93	\	85.47	14.53	1.44	2.44	1.42	4.05
29	Hece R-7933	2.80	6.80	\	89.36	10.64	1.04	1.81	1.14	2.57
30	Hece R-7936	2.12	11.68	\	84.92	15.08	1.28	2.55	2.09	3.65

Anexo 8. Análisis de la varianza (ANDEVA) y prueba de separación de medias, de la emisión de metano entérico en novillas en el experimento comparando el uso de forrajes, concentrado y monensina (Emisiones en gramos de metano entérico/kg MS consumido). Fuente: *InfoStat*.

A: Solo Forraje
B: Forraje-Concentrado-Monensina
C: Forraje-Concentrado

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo		951.21		2	475.60 17.25 <0.0001
Trat	951.21		2	475.60 17.25	<0.0001
Error	1240.65		45	27.57	
Total	2191.86		47		

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
g/kg MS	48	0.43	0.41	27.93

Separación de medias (Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=4.59812)

Error: 27.5701 gl: 45

Trat	Medias	n	E.E.
B	12.52	16	1.31A
C	21.54	12	1.52 B
A	22.19	20	1.17 B

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

Anexo 9. Análisis de la varianza (ANDEVA) y prueba de separación de medias, de la emisión de metano entérico en novillas en el experimento comparando el uso de forrajes, concentrado y un ionóforo. (Emisiones en gramos de metano entérico/kg peso vivo (PV). Fuente: *InfoStat*.

A: Solo Forraje
B: Forraje-Concentrado-Monensina
C: Forraje-Concentrado

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo		0.66	2	0.33	12.93 <0.0001
Trat	0.66	2	0.33	12.93	<0.0001
Error	1.15	45	0.03		
Total	1.81	47			

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
g/kg PV	48	0.36	0.34	28.94

Separación de medias (Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=3.35863)*Error: 24.2784 gl: 34***Separación de medias (est: Tukey Alfa=0.05 DMS=0.14010)***Error: 0.0256 gl: 45*

Trat	Mediasn	E.E.	
B	0.42 16	0.04	A
A	0.55 20	0.04	A
C	0.73 12	0.05	B

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

Anexo 10. Análisis de la varianza (ANDEVA) y prueba de separación de medias, de la emisión de metano entérico en novillas en el experimento comparando el uso de forrajes, concentrado y un ionóforo. (Emisiones en gramos de metano entérico/kg MS consumido). Fuente: *InfoStat*.

A: Solo Forraje**B: Forraje-Concentrado-Monensina****g/kg MS**

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
g/kg MS	36	0.50	0.49	27.54

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo		831.47		1	831.47 34.25 <0.0001
Trat	831.47		1	831.47 34.25	<0.0001
Error	825.46		34	24.28	
Total	1656.93		35		

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
g/kg MS	36	0.50	0.49	27.54

Trat	Mediasn	E.E.	
B	12.52 16	1.23	A
A	22.19 20	1.10	B

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

Anexo 11. Análisis de la varianza (ANDEVA) y prueba de separación de medias, de la emisión de metano entérico en novillas en el experimento comparando el uso de forrajes, concentrado y un ionóforo. (Emisiones en gramos de metano entérico/kg peso vivo (PV)). Fuente: *InfoStat*.

A: Solo Forraje

B: Forraje-Concentrado-Monensina

g/kg MS

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

<u>F.V.</u>	<u>SC</u>	<u>gl</u>	<u>CM</u>	<u>F</u>	<u>p-valor</u>	
Modelo		0.16	1	0.16	9.96	0.0033
Trat	0.16	1	0.16	9.96	0.0033	
Error	0.54	34	0.02			
Total	0.70	35				

<u>Variable</u>	<u>N</u>	<u>R²</u>	<u>R² Aj</u>	<u>CV</u>
<u>g/kg PV</u>	36	0.23	0.20	25.57

Separación de medias (Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=0.08604)

Error: 0.0159 gl: 34

<u>Trat</u>	<u>Mediasn</u>	<u>E.E.</u>	
B	0.42	16	0.03 A
A	0.55	20	0.03 B

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