



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

**POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
GANADERÍA**

DOS CONCENTRACIONES DE COBRE EN LA DIGESTIÓN DE NUTRIENTES Y EMISIÓN DE METANO ENTÉRICO EN BOVINOS

VICTOR HUGO SÁNCHEZ SÁNCHEZ

T E S I S

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:**

MAESTRO EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO

2019

CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE LAS REGALIAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACION

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, el que suscribe Ing. Víctor Hugo Sánchez Sánchez, Alumno (a) de esta Institución, estoy de acuerdo en ser partícipe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta institución, bajo la dirección del Profesor Dr. J. Efrén Ramírez Bribiesca, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis

dos concentraciones de cobre en la digestión de nutrientes y emisión de metano entérico en bovinos

y de los productos de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre del colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, El Consejero o Director de Tesis y el que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

Montecillo, Mpio. de Texcoco, Edo. de México, a 22 de Julio de 2019



Firma del
Alumno (a)



Vo. Bo. del Consejero o Director de Tesis

La presente tesis titulada: **Dos concentraciones de cobre en la digestión de nutrientes y emisión de metano entérico en bovinos** realizada por la alumno: **Victor Hugo Sánchez Sánchez** bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
GANADERÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO(A)



DR. JACINTO EFRÉN RAMÍREZ BRIBIESCA

ASESOR (A)



DRA. VINISA SAYNES SANTILLAN

ASESOR (A)



DR. JOSÉ IGNACIO GERE

ASESOR (A)



DR. DAVID HERNÁNDEZ SÁNCHEZ

Montecillo, Texcoco, Estado de México, julio de 2019

DOS CONCENTRACIONES DE COBRE EN LA DIGESTIÓN DE NUTRIENTES Y EMISIÓN DE METANO ENTÉRICO EN BOVINOS

Víctor Hugo Sánchez Sánchez, M. en C.

Colegio de Postgraduados, 2019

RESUMEN

En bovinos, se han estudiado y aplicado diferentes estrategias para inhibir la formación de metano entérico (CH_4), utilizando aditivos químicos o biológicos. La investigación con suplementos microminerales sobre la mitigación de CH_4 es limitada. El objetivo de este estudio fue evaluar dos dosis de 20 y 40 mg Cu/kg de MS en las características de la fermentación ruminal, la digestión total de nutrientes en el tracto y las emisiones de CH_4 entérico con la técnica de traza del hexafluoruro de azufre (SF_6). Seis toros Holstein se dividieron en dos grupos de tres toros y se asignaron dos dietas experimentales en un diseño cruzado. La digestibilidad total de la MS, FDN y N no mostró diferencias significativas ($P > 0.05$) entre ambos tratamientos. El tratamiento suplementado con CuSO_4 disminuyó ($P < 0.001$) la digestibilidad total del Cu en 16,6 unidades que el tratamiento sin el suplemento de Cu. El pH, la concentración de AGV y la proporción de acetato: propionato en el rumen no tuvieron diferencias significativas ($P > 0.2$) entre ambos tratamientos. Las emisiones de CH_4 en el tratamiento con Cu tendieron ($P < 0.1$) a disminuir 49 unidades. Como conclusión, recomendamos usar dosis de 40 mg Cu/kg en el ganado, la digestibilidad de los nutrientes no cambia y las emisiones de metano entérico tienden a disminuir.

Palabras claves: Metano, SF_6 , Cobre, Gases de efecto invernadero, Digestibilidad, AGV

DOS CONCENTRACIONES DE COBRE EN LA DIGESTIÓN DE NUTRIENTES Y EMISIÓN DE METANO ENTÉRICO EN BOVINOS

Víctor Hugo Sánchez Sánchez, M. en C.

Colegio de Postgraduados, 2019

ABSTRACT

In cattle, different strategies have been studied and applied to inhibit the formation of enteric methane (CH₄), using chemical or biological additives. Research with micromineral supplements on CH₄ mitigation is limited. The objective of this study was to evaluate two doses of 20 and 40 mg Cu/kg DM on ruminal fermentation characteristics, total tract digestion of nutrients and enteric CH₄ emissions with the trace technique of sulfur hexafluoride (SF₆). Six Holstein bulls were divided into two groups of three bulls and assigned to two experimental diets in a crossover design. Total digestibility of DM, NDF and N did not show significant differences ($P>0.05$) between both treatments. The treatment supplemented with CuSO₄ decreased ($P<0.001$) the total digestibility of Cu by 16.6 units than the treatment without Cu supplement. The pH, VFA concentration and acetate: propionate ratio in the rumen did not have significant differences ($P>0.2$) between both treatments. The CH₄ emissions in the treatment with Cu tended ($P<0.1$) to decrease 49 units. As conclusion, we recommend using doses of 40 mg Cu/kg in cattle, the digestibility of nutrients does not change and enteric methane emissions tend to decrease.

Key words: Methane, SF₆, Copper, Greenhouse gases, Digestibility, AGV

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONACYT), por la beca otorgada durante los estudios de Maestría.

Al Colegio de Postgraduados por permitirme realizar mis estudios, así como a las fuentes de financiamiento para realizar mi proyecto **“DOS CONCENTRACIONES DE COBRE EN LA DIGESTIÓN DE NUTRIENTES Y EMISIÓN DE METANO ENTÉRICO EN BOVINOS”**.

Al Dr. Efrén Ramírez Bribiesca por la confianza, apoyo, paciencia y dedicación que tuvo a lo largo de mi formación y las facilidades que me otorgó para realizar el experimento.

A mis profesores del programa de Ganadería de quienes adquirí conocimientos de gran valor.

A todas aquellas personas, que con su apoyo facilitaron la realización de esta tesis.

DEDICATORIA

A MI FAMILIA...

CONTENIDO

RESUMEN	iv
ABSTRACT	v
LISTA DE CUADROS	x
INTRODUCCIÓN	1
JUSTIFICACIÓN	2
HIPÓTESIS	2
OBJETIVOS	3
General	3
Particulares	3
REVISIÓN DE LITERATURA	4
Definición de los gases de efecto invernadero	4
Dióxido de carbono	5
Óxido nitroso	6
Metano	7
Importancia de la ganadería en el calentamiento global	8
Población microbiana y su efecto en la metanogénesis	8
Efectos de la dieta en la formación de metano	9
Madurez del forraje y manejo de la pastura	10
Factores en el forraje	11
Componentes que disminuyen las emisiones de metano en los rumiantes	12
Selección genética	12
Tamaño de la partícula	12
Calidad del forraje	13
Ensilajes	13
Inclusión de leguminosas	13
Uso de lípidos	13
Ionóforos	14
Defaunación ruminal	15
Fisiología en la disminución de metano	16
Técnica con hexafluoruro de azufre (SF ₆)	16

MATERIALES Y MÉTODOS	19
Lugar y guía de cuidado animal.....	20
Animales y diseño experimental	20
Dieta experimental y alimentación	20
Muestreo y Cálculos	21
Digestibilidad de nutrientes (%).....	22
Análisis de laboratorio	22
Análisis estadístico	23
RESULTADOS	25
DISCUSIÓN	26
Digestibilidad	26
pH y proporción molar de AGV	27
Emisión de metano	27
CONCLUSIÓN	29
LITERATURA CITADA.....	30

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1 Poder del Calentamiento Global (PCG) de los GEI.	6
Cuadro 2 Composición de ingredientes y nutrientes (% de ms) de dietas experimentales.	23
Cuadro 3 Medias de digestibilidad, pH y ácidos grasos volátiles ruminales, y emisión metano de toros alimentados con forraje.	25

INTRODUCCIÓN

Una preocupación de la sociedad y los gobiernos, es el problema que está ocasionando el cambio climático a la tierra (Meinshausen et al., 2009). Por sectores, la actividad agrícola representa el 60% de las emisiones de bióxido de carbono (CO₂), metano CH₄ y óxido nitroso (N₂O); mientras la actividad ganadera contribuye del 10 al 12% de las emisiones antropogénicas totales de gases de efecto invernadero (Smith et al., 2008). Específicamente el CH₄ formado por los rumiantes, es el producto final de la fermentación de los alimentos en el rumen, que en términos de energía, es una pérdida de más de 10% (Johnson y Johnson, 1995) y contribuye al calentamiento climático. Las estrategias que han tenido éxito en la mitigación de CH₄ son aquellas que conducen a una mejor rentabilidad en leche y producción de carne, asociado con menores emisiones de CH₄ entérico (Grainger et al., 2010).

Las estrategias para disminuir las emisiones de CH₄ en los rumiantes van desde la selección genética, manejo del ambiente, uso de modificadores de la digesta, vacunas y estrategias alimenticias como la cantidad de alimento consumido o la composición de la dieta (gramíneas o leguminosas) (Johnson y Johnson, 1995). Numerosas opciones han sido discutidas como estrategias para mitigar las emisiones de CH₄ procedentes de la ganadería (Kumar et al., 2014). La manipulación del ecosistema microbiano en el rumen puede mejorar la digestibilidad de los alimentos fibrosos y reducir las emisiones de CH₄ (Patra et al., 2006; Guglielmelli et al., 2011). En el caso de la participación de los minerales en la mitigación de metano hay estudios con el azufre (S) y cobre (Cu). Específicamente un estudio realizado por nuestro grupo de investigación ha demostrado que las concentraciones de Cu a dosis de 40 g/kg disminuyeron la producción de CH₄ In vitro (Hernández, et al., 2016). Al parecer existen diversas metaloenzimas dependientes de cobre, las cuales realizan acciones fisiológicas que pueden controlar o disminuir la presencia de arqueas en el rumen (Friedan, 1980). No hay un trabajo realizado In vivo que indique si la dosis de cobre citada anteriormente pueda tener un efecto sobre la formación de metano entérico.

JUSTIFICACIÓN

La celulosa es el componente principal de la pared celular en las plantas, su degradación en los rumiantes se da por la acción de los microorganismos anaerobios, que llevan a cabo el proceso fisiológico denominado fermentación entérica. Durante el proceso se liberan iones de hidrógeno, combinándose estos con el carbono y se genera CH_4 . El CH_4 , conjuntamente con el CO_2 , llenan el espacio libre en la parte superior del rumen y es expulsado por las contracciones conocidas como eructo (Crutzen et al., 1986; Jensen, 1996; Moss et al., 2000).

HIPÓTESIS

La ganadería contribuye en aproximadamente con un 18% a la contaminación, principalmente con las emisiones de metano. Por tal motivo, se continua estudiando diferentes nutrientes y modificadores que disminuyen las emisiones de CH_4 . El suplemento de cobre a dosis dobles de lo que recomienda la NRC (NASEM, 2016; NRC., 2001) disminuye la concentración de CH_4 entérico en los bovinos.

OBJETIVOS

General

Evaluar la digestibilidad de los nutrientes y la emisión de metano entérico en bovinos alimentados con una dosis adecuada (20 mg/kg MS) y una dosis alta (40 mg/kg MS) de cobre en la dieta.

Particulares

- 1.-Evaluar la digestibilidad total de los nutrientes (materia orgánica, nitrógeno, fibra detergente neutro y cobre).
- 2.- Evaluar en rumen: pH, producción de ácidos grasos volátiles (acético, propiónico y butírico).
3. Cuantificar el CH₄ entérico con la técnica de hexafloruro de azufre (SF₆).

REVISIÓN DE LITERATURA

Definición de los gases de efecto invernadero

Los principales gases de efecto invernadero (GEI) emitidos por las actividades antropogénicas a nivel mundial son CO_2 , CH_4 y N_2O . El efecto invernadero es un fenómeno por el cual los gases citados son retenidos debido a la energía que el suelo emite por haber sido calentado por la radiación solar. De acuerdo con el actual consenso científico, el efecto invernadero es más prominente en la Tierra, ocasionado por los gases como el dióxido de carbono y el metano (Will et al., 2014). Aproximadamente 40% de los ecosistemas y gran parte de los océanos han sido transformados para servir a las necesidades humanas, en consecuencia se pone en riesgo la sobrevivencia de otras especies y hay pérdida en el desarrollo eco sistémico (Cardinale et al., 2012; Power, 2010). Las concentraciones atmosféricas de CO_2 y CH_4 han aumentado en los últimos 150 años; aunque el CO_2 es el gas más influyente en el cambio climático, las emisiones netas de CO_2 en la agricultura son menores en comparación con las de CH_4 (IPCC., 2013).

El CH_4 es el segundo gas de efecto invernadero, influye de 21 a 25 veces al potencial de calentamiento global (GWP) por cada gramo de CO_2 (IPCC., 2013). La ganadería produce alrededor de 7.1 giga-toneladas equivalentes de CO_2 al año (GT CO_2 eq); esta cantidad equivale a 15% de las emisiones antropogénicas de GEI según la (FAO, 2013). En rumiantes, la fermentación entérica produce alrededor de 2.8 GT CO_2 eq de CH_4 cada año, el 77% equivale exclusivamente a ganado de producción (FAO, 2013). La causa principal del incremento en las emisiones de éstos GEI son las actividades relacionadas con el sector energético que representan 26% de las emisiones, seguido del sector industrial (19%), forestal (17%), agrícola (14%), residencial y comercial (8%) y de manejo de desechos (3%) (IPCC., 2013). Aunque las actividades agrícolas son la cuarta causa de emisiones de GEI, éste sector emite una mezcla de gases que no

precisamente no es todo CO₂ (Montzka et al., 2011). Estos gases incluyen al N₂O y el CH₄ con un poder de calentamiento 265 y 28 veces, respectivamente (IPCC., 2013). Generalmente los esfuerzos de mitigación en el sector agropecuario se han orientado a la disminución de las emisiones de los GEI en las actividades ganaderas, manejo de suelos agrícolas y en el estiércol (Santillán et al., 2016).

Dióxido de carbono

Las emisiones de CO₂ en el sector agropecuario son bajas y representan de 3 a 4.5% (Sauerbeck, D. R., 2001), por lo que no se considera un GEI importante en las actividades agrícolas. Los efectos indirectos de CO₂ derivadas del sector agrícola pueden ser importantes al reducir la fertilidad de los suelos cultivados (Paustian, et al., 2000). El CO₂ no tiene una participación importante en las emisiones, ya que representa el 0.5% de las emisiones en la agricultura, esta pérdida de carbono en forma de CO₂ puede tener efectos importantes en la fertilidad de los suelos agrícolas (Santillán et al., 2016). Por otro lado, el sector ganadero participa indirectamente en las emisiones de CO₂ con la fermentación del estiércol (Santillán et al., 2016).

El CO₂ es el gas que contribuye en mayor medida al calentamiento, simplemente porque sus emisiones y concentraciones son más altas que las de otros gases. El CH₄ es el segundo gas de efecto invernadero más importante. Después de su emisión el CH₄ permanece en la atmósfera aproximadamente de 9 a 15 años. El poder de retención de calor del CH₄ es unas 21 veces superior al del CO₂ en un período de más de 100 años.(Steinfeld et al., 2009). Las concentraciones atmosféricas de CH₄ se han incrementado en aproximadamente un 150% desde la era preindustrial, el N₂O es el tercer gas de efecto invernadero con mayor potencial para el calentamiento directo. Aunque está presente en la atmósfera en cantidades muy reducidas, sin embargo, su capacidad de retención de calor es 296 veces superior a la del CO₂ y su tiempo de permanencia en la atmósfera es muy largo aproximadamente 120 años (Cuadro 1).

Cuadro 1 Poder del Calentamiento Global (PCG) de los GEI.

	Inventario de los parámetros o indicadores	PCG	Tiempo de vida en años	Unidad
El cambio climático o potencial de calentamiento global (PCG)	Dióxido de carbono (CO ₂)	1	Variable	kg CO ₂ -eq
	Metano (CH ₄)	21	12	kg CO ₂ -eq
	Óxido nitroso (N ₂ O)	296	120	kg CO ₂ -eq
	HFC-23 (CHF ₃)	11700	264	kg CO ₂ -eq
	SF ₆	23900	3200	kg CO ₂ -eq

Fuente: (Climate Change 1995, The science of climate Change: Summary for policymakers Technical Summary of the Working Group 1 Report, pagina 22. Disponible en: <http://unfccc.int>, n.d.)

Óxido nitroso

La concentración atmosférica de N₂O es 19% mayor en comparación con su concentración previa a la Revolución Industrial y tiene un tiempo de permanencia de 120 años en la atmósfera (Flückiger et al., 2004). La actividad agrícola es la fuente más importante de N₂O emitido en los suelos (Snyder, et al., 2009), representando el 8% de las emisiones totales de GEI. Estas emisiones se originan de suelos cultivados, desechos animales y quema de la biomasa (Montzka et al., 2011). En el caso de suelos cultivados, las emisiones de N₂O se relacionan con el uso inadecuado de fertilizantes nitrogenados (Snyder, et al., 2009). En las últimas 6 décadas la producción antropogénica de nitrógeno para su uso en fertilizantes ha aumentado las tasas de fijación (Sutton et al., 2011). Valores de 100 Tg de N se han añadido en los suelos cada año (Erisman et al., 2008). Este incremento en los fertilizantes ha modificado el ciclo de N en su forma reactiva, abreviado como Nr (Delgado y Follett, 2010). El uso exagerado de fertilizantes incrementa la pérdida de Nr, éste es ampliamente dispersado por el transporte hidrológico en forma de amoníaco (NH₃), amonio (NH₄) y nitrato (NO₃⁻) (Galloway, et al., 2003). El Nr también puede ser dispersado por vía atmosférica en forma de óxido nitroso (N₂O) y óxidos de nitrógeno (NO_x) (Weathers,

et al., 2013). En asociación, las actividades pecuarias también son las responsables de cantidades importantes de estos gases. Las emisiones directas del ganado provienen de la actividad respiratoria de las especies animales, en forma de CO₂. El estiércol de los bovinos también es una fuente de emisiones de CH₄, N₂O, NH₃ y CO₂.

Metano

El CH₄ tiene un potencial de calentamiento 28 veces mayor en comparación con el CO₂ y un tiempo de residencia en la atmósfera de 9 a 15 años (IPCC., 2013). Este es emitido por fuentes naturales, actividades humanas y ganaderas (FAOSTAT, 2016). Más del 60% de las emisiones de CH₄ son originadas de las actividades humanas, las cuales han duplicado en las dos últimas décadas (Denman, et al., 2007). En el sector agropecuario las emisiones de CH₄ dominan la presencia en un 52%, mientras que el N₂O en 44% y el CO₂ en 4% (Montzka et al., 2011). Las emisiones de CH₄ del sector agropecuario provienen de la fermentación entérica de los rumiantes, los cultivos de arroz, la quema de biomasa y desechos animales (Bousquet et al., 2006). La concentración atmosférica del CH₄ se ha triplicado desde los tiempos preindustriales. La tasa de incremento del metano atmosférico está determinada por el equilibrio entre las emisiones superficiales y la destrucción fotoquímica por el radical hidroxilo. También se observan grandes fluctuaciones en la tasa de crecimiento del metano atmosférico de un año a otro, pero sus causas siguen siendo inciertas (Bousquet et al., 2006).

La ganadería contribuye a la emisión y acumulación de CH₄ en forma directa con la digestión microbiana anaeróbica de los alimentos en el tracto digestivo, lo cual se conoce como fermentación entérica. Los rumiantes producen, aproximadamente, el 97% del CH₄ emitido anualmente por los animales domésticos (Johnson, et al., 2000). Este gas es el segundo de importancia al efecto invernadero y responsable del 18% de este problema (Beauchemin et al., 2008; Moss et al., 2000).

Importancia de la ganadería en el calentamiento global

La producción pecuaria puede ser en pastoreo o confinamiento, esta última ocurre dentro de instalaciones donde se generan altas cantidades de estiércol (Mallin et al., 2015) y pueden usarse como fertilizantes (Li et al., 2016). La aplicación de estiércol en tierras agrícolas de ganado es una práctica general que aporta nutrientes para el desarrollo de praderas, pero esta práctica fomenta la contaminación del ambiente a través de materiales peligrosos que pueden hallar en el estiércol (Sukul et al., 2009). Los sistemas pastoriles han afectado el medio ambiente, principalmente en zonas donde existían bosques naturales han propiciado la expansión de cultivos agrícolas, generado erosión e trastornos geológicos (Santacoloma Varón, 2011).

Los rumiantes han contribuido de forma importante con la producción de CH₄ I y se estima que su contribución es del 90 % (Johnson y Johnson, 1995). Los efectos que tiene la ganadería. Así, el sector ganadero tiene influencia en la calidad del aire, el clima, suelo y calidad del agua, alterando los ciclos de nitrógeno, fósforo y carbono (Leip et al., 2015). Los países en desarrollo muestran incrementos en el consumo de carne anual per cápita, que en 1980 correspondió a 14 kg y en 2002 pasó a 28 kg (Steinfeld et al., 2009).

Estas tendencias induce a tener incremento en la producción, particularmente en los países como Brasil, India y China, éstos en conjunto abarcan las dos terceras partes de la producción de carne y más de la mitad de la producción de leche (Steinfeld et al., 2009). Además del aumento de bovinos, también se ha intensificado la cría de ganado, en las unidades de producción, se usa alimento concentrado para mejorar las eficiencias alimenticias (Ramankutty et al., 2018).

Población microbiana y su efecto en la metanogénesis

Los microorganismos del rumen mantienen una simbiosis con el hospedero. Las bacterias, protozoos y hongos en el retículo-rumen son responsables de la digestión

de nutrientes (Carmona et al., 2005). Las bacterias metanogénicas forman parte de las Archeobacterias, éstos son organismos anaerobios estrictos, y requieren condiciones libres de oxígeno y potencial redox menor que -330 mV. Las técnicas para la amplificación del ADN indican que los metanógenos del rumen pertenecen al orden de *Metanobacteriales*, mientras que los órdenes *Metanosarcinales*, *Metanomicrobiales* y *Metanococcales* están presentes en niveles muy bajos, en animales adultos los órdenes *Metanosarcinales* y *Metanomicrobiales* no son bien identificables. (Ramírez et al., 2014). El CH₄ es un producto final de la degradación de la materia orgánica en medios anaeróbicos, las concentraciones de sulfato, nitrato, manganeso o hierro son bajas. La conversión de hexosas a CO₂ y CH₄ libera el 15% de la energía que está disponible en la degradación aeróbica.

Efectos de la dieta en la formación de metano

La literatura reporta que el consumo de materia seca (MS) es el principal factor que influye sobre la producción de CH₄ entérico. Las primeras investigaciones que evaluaron el efecto del consumo sobre la producción de CH₄ encontraron una estrecha relación con la cantidad de alimento y la digestibilidad de la dieta, presentándose una mayor producción de CH₄ en dietas de baja digestibilidad a un nivel de consumo de mantenimiento. Por otro lado, dietas con alta digestibilidad y consumos tres veces mayor al de mantenimiento disminuyó la producción de CH₄ en un 30% (Buddle et al., 2011).

En el rumen, el principal mecanismo para mantener una baja presión de H₂ y no afectar adversamente la fermentación de los alimentos es la metanogénesis, en este proceso se reduce el CO₂ derivado de la producción de ácido acético y butírico. Así, el CH₄ generado contribuye al aumento del efecto invernadero y reduce la retención de energía en los animales. Se pueden encontrar diferencias en la emisión de metano entérico cuando se evalúan diferentes especies forrajeras como fuente de alimento (Vargas et al., 2012). Mieres et al. (2002) encontraron que el uso de pasturas nativas producía más metano por unidad de MS consumida, a diferencia de una pastura

mejorada o introducida, esto es por el resultado de sus características composicionales. Algunos autores sugieren que la mayor producción de metano está asociado con la alimentación de forrajes tipo C4, debido al mayor contenido de carbohidratos estructurales y lignina, el menor consumo y la baja tasa de pasaje. Otros autores sugieren que en animales alimentados con forrajes tropicales se produce más metano (>8%) por unidad de energía bruta consumida que con aquéllos de zonas templadas (7%), debido a una mayor proporción de carbohidratos estructurales (Clark et al., 2011). Pero muy pocos trabajos se han enfocado en reconocer las diferencias en las emisiones de metano entre diferentes variedades de una misma especie. Es posible que las diferencias en la calidad nutricional de cada variedad dentro de una especie puedan modificar las emisiones de metano. Un estudio *in vitro* incluyó ryegrass con 12% más de azúcares solubles, y mostró una reducción de metano en un 10% (Lovett et al., 2004). Así mismo, la inclusión de leguminosas tropicales bajas en taninos condensados ha presentado un aumento en las emisiones de metano por unidad de materia orgánica fermentada, esto asociado a una mejor degradabilidad de nutrientes. (Hess et al., 2003) evaluaron la inclusión de una leguminosa baja en taninos (*Arachis pinto*) en proporciones crecientes (33, 66 y 100%) en una dieta con gramínea (*Brachiaria humidicola*) y encontraron una relación lineal creciente entre la inclusión de leguminosa y la producción de metano por unidad de fibra detergente neutra fermentada.

Madurez del forraje y manejo de la pastura

Se reporta una disminución del 22% en las emisiones de metano por unidad de producto animal cuando se compara un manejo tradicional de la pastura (continuo, sin rotación, sin fertilización) con un manejo intensivo rotacional (con fertilización y resiembra), este comportamiento se da por un aumento en la producción y calidad del forraje, reflejándose mejor eficiencia animal a través del año (DeRamus et al., 2003). La emisión de metano por unidad de MS consumida también disminuye cuando se incrementa el nivel de fertilización de la pastura (Ellis et al., 2012). Existe una disminución del 8% en la producción de metano cuando se comparó una fertilización

de 450 vs 150 kg de nitrógeno por hectárea año. Sin embargo en pasturas asociadas de gramínea y leguminosa no hubo diferencias en las emisiones de metano cuando se aplicó una fertilización nitrogenada (Martin et al., 2010). En el caso de usar forrajes tiernos, la producción de metano en forrajes es menor, la respuesta es asociación más tiernos podría estar asociada a una mayor concentración de ácido linolénico, azúcares solubles, y una mayor tasa de paso son mayores. Otras explicaciones podrían estar asociadas a las mayores digestibilidades de los forrajes tiernos y el cambio que esta mayor digestibilidad genera en el pH ruminal.

Factores en el forraje

Lípidos: Los ácidos grasos insaturados tienen la capacidad de capturar hidrógeno debido a los procesos de biohidrogenación ruminal, (Beauchemin et al., 2007) sin embargo su eficiencia es mucho menor que la formación de metano (Johnson y Johnson, 1995), sugiriendo que forrajes más jóvenes tendrían mayor potencial de reducción de CH₄.

Carbohidratos solubles - Los forrajes maduros tienen una mayor concentración de carbohidratos estructurales que ha sido relacionada directamente con una mayor producción de metano (Sun et al., 2010)

Tasas de paso: (Piñares-Patiño et al., 2007) han relacionado inversamente la tasa de paso con la producción de metano debido a una mayor extensión en la degradabilidad de la fibra resultando en una mayor producción de metano.

pH ruminal: Forrajes jóvenes tienen mayor digestibilidad que aquellos maduros (Navarro-Villa et al., 2011) esta diferencia implicaría una mayor concentración de AGV en el fluido ruminal y por lo tanto un menor pH.

Componentes que disminuyen las emisiones de metano en los rumiantes

La producción de CH₄ entérico depende de la fermentación ruminal y de los parámetros productivos del animal, tales como peso, ganancia de peso, producción de leche y porcentaje de grasa y/o proteína, así como de las cantidades de alimento y de la microflora ruminal presente en el animal (Dämmgen et al., 2012). De igual forma la producción de metano depende de la calidad, de la dieta de tal manera que el alimentar con dietas altas en concentraciones de energía metabolizable se considera un método eficaz para reducir las emisiones de metano entérico, con sistemas de producción normales, utilizados en la práctica (Yan et al., 2010).

Selección genética

La genética del animal es capaz de potenciar la eficiencia productiva de este. Estos indican que la producción endógena de metano tiene una base genética, con índices de heredabilidad entre 0,35, para la producción solo de metano endógeno y 0,58 para la producción endógena de metano por contenido de grasa y proteína, con índice de correlación genética entre la producción de metano de la primera y la última lactación de 0,36. Demostrando estos valores que aunque los efectos ambientales juegan un papel muy importante en la producción de este gas, existe un porcentaje hereditario que tiene una importante influencia (de Haas et al., 2011).

Tamaño de la partícula

La molienda del forraje reduciría la producción de metano a nivel ruminal, al promover una mayor tasa de pasaje, limitando la fermentación de la fibra a nivel ruminal y por ende la disponibilidad de CO₂ e hidrógeno, para las metanogénicas (Johnson and Johnson, 1995).

Calidad del forraje

Mejorar la digestibilidad del forraje en animales en pastoreo es la manera práctica de reducir las emisiones de metano por unidad de producto generado (Hergarty, 1999a). Sin embargo se debe considerar que al incrementar la digestibilidad de un forraje se mejora el consumo y esto generalmente se asocia al aumento en CH₄ por animal, pero menor producción por kg de alimento consumido (Wittenberg, 2008).

Ensilajes

Se han determinado una tendencia lineal en la reducción en la relación de metano/consumo de materia seca en novillos, conforme se aumentó la madurez del ensilaje de maíz, como resultado de un incremento en la concentración de almidón y reducción en la fibra, cambios asociados a una mayor producción de ácido propiónico con respecto a acetato, lo que causa menor disponibilidad de H₂ para la formación de metano (Mc Geough et al., 2010).

Inclusión de leguminosas

Una de las mejores estrategias para reducir la emisión de metano en sistemas de pastoreo es la inclusión de leguminosas en la mezcla forrajera, lo que se atribuye a una menor proporción de carbohidratos estructurales y a mayor tasa de pasaje, lo cual modifica la fermentación ruminal hacia una mayor producción de ácido propiónico (Wittenberg, 2008).

Uso de lípidos

Una de las opciones más evaluadas para la mitigación de CH₄, es la adición de grasas en las dietas del bovino, ya que al adicionarla se disminuyen las emisiones de este, mediante la reducción de microorganismos fermentadores en el rumen, especialmente

la actividad de bacterias metanogénicas y los protozoarios, además de que los lípidos ricos en ácidos grasos insaturados, son capaces de capturar hidrógenos a través de la biohidrogenación de estos lo que reduce la disponibilidad de H₂ para la formación de metano (Johnson y Johnson, 1995). Según Hergarty (1999b) algunas bacterias productoras de metano están íntimamente relacionadas con protozoarios, lo que establece la asociación del conteo de protozoarios y la disminución del CH₄. Esta simbiosis metanógeno-protozoo se confirma al afirmar que el 37% de la metanogénesis ruminal se origina de esta simbiosis (Hergarty, 1999b).

Si bien los lípidos pueden ser una alternativa para reducir las emisiones de metano, su inclusión puede afectar la palatabilidad, consumo, respuesta animal y componentes lácteos, lo cual tiene implicaciones a nivel de ganadería comercial (Odongo et al., 2007).

Ionóforos

Experiencias positivas sobre el uso de ionóforos y reducción de CH₄ han sido documentadas (Van Vugt et al., 2005) con el uso de capsulas de monensina a vacas estabuladas con pasto ryegrass, se redujo en 9% en las emisiones de metano (g/kg de MS), persistiendo así durante más de 2 meses después de recibir las cápsulas. De igual forma, otros autores (Odongo et al., 2007) notaron que vacas lecheras alimentadas con una dieta que contenía 24 mg de monensina/kg de MS redujeron 9% la producción de metano en g/KgPV, manteniéndose por 6 meses. Debido a su clasificación como promotores de crecimiento su utilización a futuro depende de las políticas y conceptos de bienestar animal. La Unión Europea lo enlista en los productos no permitidos en la alimentación animal, por lo que su utilización es restringida, convirtiéndolo en un método no aplicable en la comunidad europea.

Defaunación ruminal

Una de las técnicas más estudiadas es la defaunación ruminal, notando que la eliminación completa de los protozoos ciliados del rumen reduce la emisión de metano entre 50 y 60% (Ushida et al., 1986), mientras otros autores (Beauchemin et al., 2009) demostraron que la eliminación de protozoarios se puede lograr mediante la adición de lípidos, al causar una reducción entre 37 y 38% de la cantidad de protozoos, mientras que al adicionar semilla de canola y de girasol, se logra una reducción de metano entre 11 y 17%.

El uso de fitoquímicos en la dieta, inhibidores de protozoarios, como las saponinas provenientes de fuentes comerciales de plantas del desierto: *Yucca schidigera* (núcleo esteroideo) de México y *Quillaja saponaria* (triterpenoides) de Chile, se consideran una opción para reducir las emisiones de metano ruminal (Cheeke, 2000). Mediante estas mismas técnicas (Valdez et al., 1986) se observaron *in vitro*, que la cantidad de protozoarios disminuyeron linealmente desde 36000 a 29000/ml, conforme la concentración de saponina aumentó de 0 a 77 ppm de sustrato. Similarmente otros autores (Lila et al., 2003) mencionan una reducción en la actividad de los protozoos con tratamiento de saponina en estudios *in vitro*, sin embargo estos autores afirman que la actividad de la saponina sobre los protozoos no siempre se observa *in vivo*. Las saponinas han producido diferentes respuestas con respecto a la producción de CH₄, esta variación se puede deber a las diferencias en la fuente de saponina o nivel de dosis utilizado; pues el efecto de estas en la producción de CH₄, a veces, pero no siempre, produce una disminución en la digestibilidad de la fibra (Holtshausen et al., 2009). De igual forma el uso de fumarato en la mitigación de metano ha sido ampliamente investigado, tanto *in vitro* como *in vivo*, observando resultados positivos (Asanuma et al., 1999), pero en otros estudios reportan que la administración de cantidades considerables de Ca-fumarato (420 g/vaca por día) ha sido convertida totalmente a propionato, y este habría disminuido las emisiones de CH₄ en sólo 11 g/d (2,6%) (van Zijderveld et al., 2011).

Fisiología en la disminución de metano

Una acumulación excesiva de H^+ aumentaría la presión osmótica y disminuiría el pH a valores nocivos. Los AGV son absorbidos a través de las paredes del rumen y el H^+ es eliminado tras la formación de metano. Un bovino produce diariamente cientos de litros de gas, especialmente CO_2 y metano, que deben ser eliminados por eructación (Relling y Mattioli, 2003). El rumen y otros sistemas anaerobios es que los rumiantes degluten suficiente saliva y agua, de forma tal que el tiempo de retención de la digesta en el tracto gastrointestinal (TGI) es menor de un día. Este corto tiempo de retención no permite el desarrollo de organismos de crecimiento lento que consumen ácido: acetógenos productores de H_2 (oxidan sustratos como etanol, butirato o propionato y disponen de electrones por reducción de H^+ a H_2) y metanógenos acetotróficos (metanógenos capaces de descarboxilar acetato a CH_4 y CO_2). Por tanto, los ácidos grasos de cadena corta como el acético, propiónico y butírico no se utilizan como sustrato para la metanogénesis ruminal (Abecia et al., 2012). La conversión anaeróbica de materia orgánica a CH_4 en el rumen involucra una comunidad de microorganismos donde los metanógenos intervienen en el paso final. Primeramente, las bacterias, hongos y protozoos fermentan las proteínas, polisacáridos y lípidos para producir aminoácidos y azúcares, y fermentan estos últimos a ácidos grasos de cadena corta, H_2 y CO_2 . El CH_4 se forma entonces por los metanógenos ruminales, los que usan el H_2 (80 %) y el formiato (18 %) como sustratos (Bryant, 1979). Sin embargo numerosas investigaciones encaminadas a estudiar el proceso de formación de metano en el rumen y los factores que intervienen, coinciden en que el nivel de alimentación, los tipos de alimentos y su digestibilidad influyen en la cantidad de metano que se produce (Díaz-Monroy and Castañeda-Caguana, 2014).

Técnica con hexafluoruro de azufre (SF_6)

La mayoría de estos ensayos se ha realizado en Nueva Zelanda (Judd et al., 1999; Ulyatt et al., 2002), Australia (Grainger et al., 2010), Canada (McCaughey et al., 1997), Brasil (Pedreira et al., 2009), Argentina (Bárbaro et al., 2008) y Uruguay (Dini et al.,

2012). En México no hay publicaciones de su uso hasta el momento. La técnica del trazador de hexafluoruro de azufre (SF₆) (Johnson et al., 1994) fue modificada por Gere y Gratton (2010). Esta técnica se utilizó para cuantificar las emisiones de CH₄. Habitualmente, se colecta aire a pocos centímetros del ollar del animal durante un lapso largo (por ejemplo 24 h) donde el efecto promediado de las liberaciones provenientes del rumen, conduce a que en la muestra recolectada la concentración de CH₄ sea mucho mayor que en una muestra de aire “puro” (los valores típicos están entre 10 y 50 ppmv, respecto de las 1.7 ppmv para el aire atmosférico limpio recolectado fuentes concentradas importantes de CH₄).

Si fuese posible evaluar con razonable precisión que fracción del gas emitido es recolectada, la concentración de CH₄ en la muestra permitiría determinar la cantidad de CH₄ liberada en el lapso de recolección. Pero esa fracción depende de una multitud de factores ambientales poco controlables, de manera que debe, a su vez, ser contemporaneamente medida o referenciada. La idea es colocar en el rumen del animal en estudio una capsula que emite un gas, en este caso hexafluoruro de azufre (SF₆), a una tasa constante conocida como tasa de permeacion (TPER). El trazador también se acumula en el rumen y es liberado en los eructos junto con el CH₄ (Johnson et al., 1994). El SF₆ permite relacionar la concentración en el gas colectado con la tasa de liberación. Ello significa que si la cantidad total de trazador liberada en el lapso de muestra es conocida, multiplicando esta cantidad por la razón de las concentraciones CH₄/SF₆ en la muestra recolectada (descontando previamente los concentraciones de base (BG)) se obtiene la emisión de CH₄ en el mismo lapso. De esta manera, la emisión estaría dada por la Ecuación:

$$E_m = TPER \cdot \frac{([CH_4] - BG_{CH_4})}{([SF_6] - BG_{SF_6})}$$

Obviamente, el trazador elegido debe cumplir con ciertos requisitos: No debe ser ni toxico ni químicamente reactivo, debe encontrarse en muy bajas concentraciones en la atmosfera “pura” y debe ser posible medir su concentración hasta valores muy bajos,

porque el volumen que se acumula en el rumen debe ser despreciable respecto al volumen de CH₄. El SF₆ cumple con estos requisitos (Maiss et al., 1996), ya que es un gas muy inerte, presente en la atmosfera “pura” en concentraciones del orden de 6 pptv, es decir, en el rango de las concentraciones que pueden ser determinadas con precisión mediante cromatografos dotados de detectores de captura electrónica. Además, ha sido probado que el SF₆ no tiene ninguna interferencia con la fermentación ruminal.

Los tubos de permeación (TP) contienen una conocida cantidad de sustancia gaseosa través de una membrana porosa. Los TP han sido ampliamente usados para desarrollar y evaluar procedimientos analíticos confiables. La principal ventaja de estos dispositivos es que pueden ser calibrados de manera sencilla, gravimétricamente. Entre otras aplicaciones pueden nombrarse la preparación de estándares primarios para el análisis de gases traza que pueden ser reactivos o tóxicos en concentraciones tan bajas como las partes por billón (10⁻⁹) (Scaringelli et al., 1970).

La utilidad en la medición de emisiones de metano de rumiantes en pastoreo, porque en la técnica empleada se requiere el empleo de una fuente precalibrada de SF₆, que se inserta en el rumen del animal y, por comparación, da el valor de esas emisiones (Johnson et al., 1994). Habitualmente, el SF₆ es colocado dentro de un pequeño tubo de bronce, TP, desde el cual el flujo saliente del trazador queda regulado por el espesor de una membrana de teflón que cierra el tubo en un extremo.

Si bien durante periodos breves (del orden de algunas semanas) la tasa de permeación (TPER) permanece constante, deja de serlo sobre periodos mayores (en el momento en que la cantidad de SF₆ disminuye significativamente) (Lasseey et al., 2001), violando una de los principales requisitos para emplear los TP como fuente del trazador. De esta manera, el uso de la TPER precalibrada es válida para periodos del orden de no más que 60 o 90 días. Para experimentos más largos es necesario “ajustar” la TPER. Existen algunas explicaciones para la pérdida de la linealidad en la

liberación de SF6 con el tiempo: la condensación de otros constituyentes atmosféricos (tales como el vapor de agua y el CO₂) durante el llenado, interacción fisicoquímica entre el SF6 y la membrana y la distorsión mecánica del teflón. Cuando se requiere monitorear la emisión de metano sobre largos periodos, por ejemplo un año, se pueden observar, como consecuencia, diferencias importantes (del orden del 12%) si no se corrigen los valores de TPER (para lo que es necesario recuperar los TP) (Swainson et al., 2011).

MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar y guía de cuidado animal

El estudio se realizó en el Colegio de Postgraduados, Montecillo, México. El clima es templado, semiseco, con una temperatura promedio anual de 15.9 ° C. La unidad del experimento está ubicada en las coordenadas 19 ° 28 '05' 'latitud norte y 98 ° 54' 09 " longitud oeste y altitud de 2220 metros sobre el nivel del mar. El cuidado de los animales durante la cirugía y el experimento se realizó de acuerdo con las Normas de Bienestar expedidas por SAGARPA (Muñoz, 2001).

Animales y diseño experimental

El estudio se realizó con seis toros Holstein ($570 \pm 2,1$ kg) equipados con cánulas en el rumen. Las cirugías se realizaron cuatro meses antes del inicio del experimento y se alojaron en un corral individual (1.42 x 2.74 m) con piso corrugado y equipado con bebederos automáticos. Antes del experimento, los toros fueron vacunados contra enfermedades clostridiales (Ultrabac 8®; Smith KlineBeechman Animal Health, Inc., St. Joseph, EE. UU.) Y fueron tratados por parásitos internos y externos (Ivomec Plus®; Merck, Rahway, EE. UU.). Todos los animales se dividieron en dos grupos de tres toros y se asignaron a dos dietas experimentales en un diseño cruzado con 21 d para cada período. Los dos períodos experimentales consistieron en 14 d de ajuste de la dieta seguido de 3 d para la medición de CH₄ y 4 d para el muestreo fecal y líquido ruminal.

Dieta experimental y alimentación

Las dietas experimentales que se muestran en el Cuadro 2 se formularon para mantener los requerimientos de mantenimiento para los toros (NASEM, 2016). Todos los toros fueron alimentados con un 61% de dieta forrajera, y dentro de cada grupo, estaban sin Cu (24.2 mg Cu / kg DM, contenido en el alimento), y 45.2 mg Cu/kg MS, como sulfato de cobre. La ingesta de materia seca se restringió y se ajustó para tener una GDP de 0,4 kg, por lo que todos los toros fueron alimentados con 12,48 kg de dieta basal, en dos porciones servidas a las 0700 y 1900 h. El Cu suplementario se

preparó en una solución madre y se agregó con la dieta basal en el momento de la alimentación.

Muestreo y Cálculos

Las muestras tomadas en cada período experimental se utilizaron para medir: A) Medición de la emisión de metano entérico; Se usó la técnica de traza de hexafluoruro de azufre (SF₆). B). Digestibilidad total de los nutrientes: MS, FDN, nitrógeno y cobre, y C) pH y niveles de ácidos grasos volátiles (AGV) en el rumen.

Mediciones de metano: las emisiones de metano se midieron mediante la técnica del marcador SF₆ (Johnson et al., 1994) modificado por Gere y Gratton (2010). Veinte días antes de comenzar el experimento, a todos los toros se les administraron oralmente tubos de permeación de SF₆ con un dosificador de plástico; estos fueron elegidos en base a su alta correlación ($R^2 \geq 0.99$), las tasas de permeación pre-calibradas (PR) fueron de 4.90 ± 0.52 mg/d. La muestra de aire se colectó con 2 tubos de acero inoxidable (0,5 l de volumen) (Gere y Gratton, 2010). Antes de cada período de recolección de muestras, los cilindros de acero se limpiaron con nitrógeno de alta pureza y se evacuaron (~ 1 mbar). Los reguladores de flujo se calibraron para permitir un vacío residual de aproximadamente 500 mbar al final del período de recolección de muestras. La recolección de flujo de muestra se estableció en ~ 1.2 mL / min por día. Durante el experimento, se tomaron tres muestras consecutivas por animal utilizando un período de recolección de muestras de 24 h, y simultáneamente también se recolectaron muestras de aire de fondo. Al final de la recolección, se verificó la presión en los contenedores de muestras y se retuvieron para el análisis aquellos con presión residual en el rango de ~ 500 mbar (Gere y Gratton, 2010). La emisión de CH₄ por animal se calculó utilizando el PR de cada cápsula de SF₆ y la concentración de CH₄ y SF₆. CH_4 (g/d) = PR SF₆ (g/d) x $\frac{[CH_4] - BG_{CH_4}}{[SF_6] - BG_{SF_6}}$ donde: [CH₄] y [SF₆] son las concentraciones de estos gases en los muestreadores y BG son las concentraciones atmosféricas de fondo.

Digestibilidad total de los nutrientes: Se colectaron muestras de la ración cada semana y se almacenaron para medir el contenido de MS y se realizaron otros análisis químicos. Las muestras individuales de 400 g (base húmeda) de heces se tomaron durante los días de recolección de muestras de la siguiente manera: d1, 0800 y 1400; d2, 0950 y 1550; d3, 1100 y 1700; D4, 1250 y 1850 horas post-prandiales. Las muestras fecales se agruparon por cada toro y en cada período para obtener una muestra compuesta y se almacenaron a -20 °C hasta el análisis. La digestibilidad total de cada nutriente se calculó con la siguiente fórmula (Van Keulen y Young, 1977).

Digestibilidad de nutrientes (%)

$$DN = 100 - \left[\frac{\text{Cenizas insolubles en alimento}(\%)}{\text{Cenizas insolubles en heces}(\%)} \times \frac{\text{Nutrientes en heces}(\%)}{\text{Nutrientes en alimento}(\%)} \times 100 \right]$$

Niveles de pH y AGV en el rumen: Se obtuvieron muestras de líquido ruminal de cada toro a las 1100 horas postprandial de la comida, mediante una cánula ruminal con una bomba de vacío. Inmediatamente después de la recolección, se determinó el pH del fluido ruminal utilizando un medidor de pH portátil. Las muestras de líquido ruminal se filtraron con gasa y 20 ml de líquido ruminal filtrado se mezclaron con 5 ml de ácido metafosfórico recién preparado al 25% (p/v) y luego se congelaron (-20 °C) para su posterior análisis de AGV.

Análisis de laboratorio

Las concentraciones de CH₄ y SF₆ se analizaron mediante cromatografía de gases (Shimatzu Modelo GC-2014 Greenhouse gas Analyzer). Está equipado con un detector de captura de electrones y una fuente de radiación de ⁶³Ni, y funciona a una temperatura de 325 °C. La concentración de CH₄ se analizó con un detector de ionización de flama con metanizador a 300 °C. Los gases se separaron con una columna capilar HayeSep T (20.0 m × 0.32 mm i.d.) (Hayes Separations, Houston, TX, EE. UU.) y una temperatura del horno de 80 °C. Se usó N₂ y (95 kPa) como gas

acarreador. Los tiempos de retención fueron 5.2 y 7 minutos para CH₄ y SF₆, respectivamente. Las muestras se inyectaron manualmente en el cromatógrafo utilizando una jeringa Hamilton de 5 ml de SYR (22/2 "/ 2) L.

Al final del experimento, las muestras congeladas de dietas y heces se descongelaron durante una noche a temperatura ambiente y se analizaron para determinar la MS mediante secado en un horno a 65 °C durante 48 h (AOAC. 2003). Las muestras secas de dietas y heces se molieron con un molino Christy-Norris (Christy and Norris Ltd., Chelmsford, Reino Unido). Las dietas molidas y las muestras fecales se agruparon por toro y se analizaron en materia seca (MS), nitrógeno (AOAC., 2003) y fibra detergente neutra (FDN) (Chai y Udén, 1998). El Cu fue analizado por espectrometría de absorción atómica (Tang, 1978); antes de la medición 1 g de muestra, 10 ml de H₂O desmineralizada (Millipore, Billerica, EE. UU.), 5 ml de HNO₃ y 2 ml de H₂O₂ (JT Baker, Ciudad de México, México) se colocaron en recipientes de teflón durante 10 minutos y se digirieron con horno de microondas (MAR 5, CEM, Falcon, USA). Las concentraciones de AGV en el líquido ruminal se analizaron por cromatografía de gases (Erwin et al., 1961).

Análisis estadístico

Se realizó un análisis descriptivo para las variables de estudio utilizando el software SPSS®, versión v15 (Chicago, SPSS Inc.). Los datos se presentan como media y desviación estándar. El experimento se analizó como un diseño cruzado de la siguiente manera: $Y_{ij} = \mu + A_i + T_j + e_{ij}$. Donde Y_{ij} , respuesta variable; μ , media general; A_i , efecto de animal; T_j , efecto del tratamiento y e_{ij} , error aleatorio.

Cuadro 2 Composición de ingredientes y nutrientes (% de MS) de las dietas experimentales.

Fuente	No suplementado con cobre	Suplementado con cobre
Composición de la dieta, %		
Maíz molido	15.0	15.0
Pasta de soya	15.0	15.0
Rastrojo de maíz	61.5	61.4
Maíz molido	6.0	6.0
Fosfato dicalcico	2.0	2.0
Sales minerales	0.5	0.5
Cobre como CuSO ₄	0.0	0.08
Composición de nutrientes, %		
Materia seca	89.24	89.25
Energía total, MJ/kg	17.74	17.74
ENm, MJ/kg	4.65	4.65
ENg, MJ/kg	2.30	2.30
FDN	54.15	54.15
Proteína	13.12	13.12
Calcio	0.67	0.67
Fósforo	0.25	0.25
Magnesio	0.24	0.24
Cobre, mg/kg	20.10	41.20
Sal mineralizada traza: NaSe ₃ 0.58%, CoSO ₄ , 0.68%; FeSO ₄ , 3.57%; ZnO, 0.75%; MnSO ₄ , 1.07%; KI, 0.52%; NaCl, 92.83%.		

RESULTADOS

El Cuadro 3 muestra los resultados de digestibilidad, variables en rumen y emisiones de metano en ambos tratamientos. La digestibilidad total de la MS, FDN y N no mostraron diferencias significativas ($P > 0.05$) entre ambos tratamientos. El tratamiento suplementado con el sulfato de cobre disminuyó ($P < 0.001$) la digestibilidad total de Cu en 16.6 unidades, comparado con el tratamiento sin suplemento de Cu. El pH, la concentración de AGV y relación acético: propiónico en el rumen no tuvieron diferencias significativas ($P > 0.2$) entre ambos tratamientos. Las emisiones de metano en el T+Cu expresadas en gramos y Mega Jules por día, tendieron ($P < 0.1$) a disminuir 48.8 y 2.7 unidades, respectivamente. Logicamente el Ym también tendió ($P < 0.1$) a ser más bajo en el T+Cu vs. T-sin-Cu.

Cuadro 3 Medias de digestibilidad, pH y ácidos grasos volátiles en rumen, y emisión metano de toros alimentados con forraje.

Fuente	No suplementado con cobre	Suplementado con cobre	p- valor
<u>Digestibilidad, %</u>			
Materia seca	78.33 ± 3.32	77.72 ± 3.56	0.95
FDN	62.58 ± 4.41	61.48 ± 3.81	0.96
Nitrógeno	73.41 ± 6.14	71.46 ± 4.07	1.77
Cobre	78.44 ± 3.74	58.85 ± 6.67	0.001
<u>pH y ácidos grasos volátiles (mol/100 mol)</u>			
pH	6.35 ± 0.24	6.36 ± 0.34	0.20
Acético (Ac)	76.57 ± 2.36	76.43 ± 1.88	0.96
Propiónico (Pro)	14.11 ± 1.70	14.20 ± 2.01	0.69
Butírico	7.48 ± 0.93	7.56 ± 0.73	0.38
Valérico	0.63 ± 0.09	0.65 ± 0.10	0.67
Iso-Valérico	0.67 ± 0.10	0.65 ± 0.22	0.86
Ac : Pro	5.51 ± 0.81	5.48 ± 0.86	0.33
<u>Emisión de metano</u>			
CH ₄ (g/día)	213.22 ± 50.60	164.46 ± 40.72	0.09
CH ₄ (MJ/día)	11.84 ± 2.81	9.14 ± 2.26	0.09
Ym, %	4.76 ± 1.13	3.67 ± 0.91	0.09

Ym, % = (CH₄ (MJ/día)/consumo de energía total (MJ/d)) x 100

DISCUSIÓN

Digestibilidad

La digestibilidad de la MS, FDN y N no tuvieron diferencias entre los dos tratamientos del estudio. El rastrojo de maíz fue la principal fuente de fibra que se adicionó a la dieta, este se caracteriza por alto contenido de fibra (FDN=62%) y baja proteína (~5%) (Chea, 2015; Demo-os et al., 2000). La digestibilidad promedio de la FDN y N en ambos tratamientos fue 62 y 72%; el valor de la FDN fue similar en estudio realizado en vacas (Ashry et al., 2012), mientras la digestibilidad de N fue ligeramente mayor en otros estudios (Lazzarini et al., 2015). Principalmente la digestibilidad de la FDN y N depende de la calidad del forraje y el mezclado con otros ingredientes de la ración. Un estudio realizado en beceras menciona que el suplemento de Cu y Co en la dieta mejoró la digestibilidad de fibra y la degradación de la celulosa en el rumen (Pino y Heinrichs, 2016). Estos microminerales son requeridos en la estructura de proteínas, enzimas y coenzimas que participan en procesos enzimáticos para degradar la fibra (Durand y Kawashima, 1980).

En nuestro estudio, la digestibilidad de Cu fue menor cuando se adicionó CuSO_4 ; sin embargo, una mayor cantidad de Cu suplementario aumentó la absorción y el contenido en los tejidos de sangre e hígado (Rabiansky et al., 1999). Spears (2003) en una revisión publicada menciona que la absorción de Cu en rumiantes neonatos es de 70-85% y disminuye hasta el 10% después del destete; las causas que limitan la absorción de Cu se enfocan en la interacción con otros minerales como el azufre, molibdeno y hierro de la dieta; el Fe reacciona con sulfuro y Cu formando complejos de sulfuros de Fe y Cu (Suttle y Peter, 1985); estos minerales estuvieron en niveles adecuados en nuestro experimento (NASEM, 2016). Las fuentes de Cu suplementadas también influyen en la digestibilidad y absorción de Cu, es este caso, el uso de Cu-lysine tuvo mejor disponibilidad y absorción que el Cu suplementado como CuSO_4 in beceras con hipocupremia (Rabiansky et al., 1999). Otro factor asociado a la digestibilidad de Cu, es la presencia de los tiomolibdatos, estos reaccionan con el Cu y forman tiomolibdatos de Cu insolubles en la fase sólida de la

digesta del rumen, mientras que en la fase líquida los tiomolibdatos no se unen (Gould y Kendall, 2011). Faltan estudios para evaluar la disponibilidad y absorción de los tiomolibdatos, se menciona que algunos de estos compuestos se pueden absorber a través de la pared del rumen y en el intestino delgado, o se excretan con mayor facilidad (Gould y Kendall, 2011); esta teoría hace suponer que el CuSO_4 suplementario en nuestro estudio posiblemente formó tiomolibdatos de Cu y aumentó la excreción del micromineral.

pH y proporción molar de AGV

El suplemento de Cu no modificó el pH ruminal; el promedio en ambos tratamientos fue 6.3, este valor es común cuando el contenido de celulosa proporcionada por el forraje es alto en la dieta (Eun et al., 2004; Piñeiro-Vázquez et al., 2017). No hay publicaciones que citen una modificación del pH ruminal por efecto de Cu suplementario. Principalmente un pH bajo se asocia con la alta solubilidad de una mezcla de microminerales (Spears, 1996) y con la alta proporción de sulfatos (Oltjen et al., 1962). Dietas altas en forraje son abundantes en carbohidratos estructurales y mantienen un pH ruminal mayor a 6.0, incrementando la actividad celulolítica y digestión de la fibra (Eun et al., 2004). Los cambios en la tasa de fermentación del rumen, depende principalmente del tipo de dieta (forrajes y almidones) y de las poblaciones bacterianas (Piñeiro-Vázquez et al., 2017); aunque también los microminerales orgánicos mejoran la replicación de los microorganismos ruminales y estimulan la tasa de fermentación (Pino y Heinrichs, 2016). El suplemento de Cu no modificó los niveles de AGV, pero mezclas de minerales orgánicos traza modifican la proporción molar de AGV (Underwood y Suttle, 1999), mejorando el promedio de acetato y butirato (Pino y Heinrichs, 2016).

Emisión de metano

El CH_4 entérico no mostró una diferencia, pero hubo una tendencia a disminuir la emisión de CH_4 con CuSO_4 . Un estudio realizado con becerras lecheras cita reducción de metano con suplemento de sales minerales, atribuyendo el efecto a los frotipos de

Methanobrevibacter y la competencia de iones H^+ durante la formación de propionato (Li et al., 2017). Pero no todos los minerales que se suplementaron tienen efecto antimetanogénico; principalmente los sulfatos y el cobre disminuyen la formación de metano. Datos publicados indican que el cobre es tóxico para algunas bacterias del rumen (Durand y Kawashima, 1980) y el uso de $CuSO_4$ en una prueba de fermentación *In vitro* disminuyó la emisión de metano (Hernández-Sánchez et al., 2019). Contrariamente, un estudio realizado por Biscarini et al. (2018) indicó que el suplemento de cobre modificó el microbioma del rumen pero no hubo un efecto sobre las bacterias metanogénicas y el metabolismo de metano en rumen. Al parecer la disminución de metano no es tan sencilla como parece, durante el proceso de metanogénesis hay variaciones en los 16S rRNA y la información taxonómica en los diferentes filotipos microbianos indica que hay un conjunto de microorganismos que participan en la formación de metano entérico. La concentración promedio de metano entérico en este estudio fue 189 g d^{-1} , este dato coincide con el inventario de emisiones de metano US cattle (Westberg et al., 2001), indicando valores desde 188 hasta 231 g d^{-1} en toros. La producción de CH_4 como proporción de la ingesta de ET (Y_m) obtenida fue de 4.2% promedio. Los rangos de Y_m se basan en la digestibilidad y el valor energético de las raciones. El Y_m para el ganado bovino que reporta la IPCC (2006) es de 2 hasta 7.5%, correspondientes a digestibilidades de 45 hasta 85%.

CONCLUSIÓN

Las estrategias para disminuir las emisiones de metano en rumiantes a través de la modificación de las dietas se siguen investigando. El efecto de los minerales sobre las emisiones de metano ha sido poco estudiado. Específicamente el sulfato de cobre, es una alternativa complementaria que puede contribuir a formar menos metano entérico. En nuestro estudio, el grupo con suplemento de Cu disminuyó ligeramente la formación de metano, aunque no hubo una diferencia significativa. Sin embargo, se recomienda incluirlo a la dosis de 40 g/kg en bovinos pastoreando, no se disminuye la digestibilidad de los nutrientes, no causa toxicidad en bovinos y puede mejorar la actividad de las enzimas dependientes de cobre en el organismo animal. La cantidad excretada en las heces no es riesgo de contaminación, la mayoría de los suelos en sistemas de pastoreo extensivo carecen de este micromineral.

LITERATURA CITADA

- Abecia, L., Toral, P.G., Martín-García, A.I., Martínez, G., Tomkins, N.W., Molina-Alcaide, E., Newbold, C.J., Yáñez-Ruiz, D.R., 2012. Effect of bromochloromethane on methane emission, rumen fermentation pattern, milk yield, and fatty acid profile in lactating dairy goats. *Journal of Dairy Science* 95, 2027–2036. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4831>
- AOAC., 2003. Official Methods of the AOAC, 17th Ed. Methods 920.39, 942.05, 990.03. The Association of Official Analytical Chemists:
- Asanuma, N., Iwamoto, M., Hino, T., 1999. Effect of the Addition of Fumarate on Methane Production by Ruminal Microorganisms In Vitro. *Journal of Dairy Science* 82, 780–787. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(99\)75296-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(99)75296-3)
- Ashry, G.M.E., Hassan, A.A.M., Soliman, S.M., 2012. Effect of Feeding a Combination of Zinc, Manganese and Copper Methionine Chelates of Early Lactation High Producing Dairy Cow. *Food and Nutrition Sciences* 03, 1084–1091. <https://doi.org/10.4236/fns.2012.38144>
- Bárbaro, N., Gere, J., Gratton, R., Rubio, R., Williams, K., 2008. First measurements of methane emitted by grazing cattle of the Argentinean beef system. *New Zealand Journal of Agricultural Research* 51, 209–219. <https://doi.org/10.1080/00288230809510449>
- Beauchemin, K.A., Kreuzer, M., O'Mara, F., McAllister, T.A., 2008. Nutritional management for enteric methane abatement: a review. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 48, 21. <https://doi.org/10.1071/EA07199>
- Beauchemin, K.A., Mc Ginn, S.M., Martinez, T.F., McAllister, T.A., 2007. Use of condensed tannin extract from quebracho trees to reduce methane emissions from cattle. *Journal Animal Science* 85, 1190–1196. <https://doi.org/10.2527/jas.2006-686>
- Beauchemin, K.A., McGinn, S.M., Benchaar, C., Holtshausen, L., 2009. Crushed sunflower, flax, or canola seeds in lactating dairy cow diets: Effects on methane production, rumen fermentation, and milk production. *Journal of Dairy Science* 92, 2118–2127. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1903>

- Biscarini, F., Palazzo, F., Castellani, F., Masetti, G., Grotta, L., Cichelli, A., Martino, G., 2018. Rumen microbiome in dairy calves fed copper and grape-pomace dietary supplementations: Composition and predicted functional profile. *PLOS ONE* 13, e0205670. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205670>
- Bousquet, P., Ciais, P., Miller, J.B., Dlugokencky, E.J., Hauglustaine, D.A., Prigent, C., Van der Werf, G.R., Peylin, P., Brunke, E.-G., Carouge, C., Langenfelds, R.L., Lathière, J., Papa, F., Ramonet, M., Schmidt, M., Steele, L.P., Tyler, S.C., White, J., 2006. Contribution of anthropogenic and natural sources to atmospheric methane variability. *Nature* 443, 439–443. <https://doi.org/10.1038/nature05132>
- Bryant, M.P., 1979. Microbial methane production—theoretical aspects. *Journal of Animal Science* 48, 193–201.
- Buddle, B.M., Denis, M., Attwood, G.T., Altermann, E., Janssen, P.H., Ronimus, R.S., Piñares-Patiño, C.S., Muetzel, S., Wedlock, D.N., 2011. Strategies to reduce methane emissions from farmed ruminants grazing on pasture. *The Veterinary Journal* 188, 11–17. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.02.019>
- Cardinale, B.J., Duffy, J.E., Gonzalez, A., Hooper, D.U., Perrings, C., Venail, P., Narwani, A., Mace, G.M., Tilman, D., Wardle, D.A., Kinzig, A.P., Daily, G.C., Loreau, M., Grace, J.B., Larigauderie, A., Srivastava, D.S., Naeem, S., 2012. Biodiversity loss and its impact on humanity. *Nature* 486, 59.
- Carmona, J.C., Bolívar, D.M., Giraldo, L.A., 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 Pec* 18, 49–63.
- Chai, W., Udén, P., 1998. An alternative oven method combined with different detergent strengths in the analysis of neutral detergent fibre. *Animal Feed Science and Technology* 74, 281–288. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(98\)00187-4](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(98)00187-4)
- Chea, B., 2015. erd Nutrient Value and Palatability for Cattle on Corn Stover Silage 6.
- Cheeke, P., 2000. Actual and potential applications of *Yucca schidegera* and *Quillaja saponaria* saponins. *Journal of Animal Science* 77, 1–10.

- Clark, H., Kelliher, F., Pinares-Patiño, C., 2011. Reducing CH₄ Emissions from Grazing Ruminants in New Zealand: Challenges and Opportunities. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 24, 295–302.
- Climate Change 1995, The science of climate Change: Summary for policymakers Technical Summary of the Working Group 1 Report, pagina 22. Disponible en: <http://unfccc.int>, n.d. Climate Change 1995, The science of climate Change:
- Crutzen, P.J., Aselmann, I., Seiler, W., 1986. Methane production by domestic animals, wild ruminants, other herbivorous fauna, and humans. *Tellus B* 38B, 271–284. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0889.1986.tb00193.x>
- Dämmgen, U., Rösenmann, C., Haenel, H.D., Hutchings, N.J., 2012. Enteric methane emissions from German dairy cows. *Agriculture and Forestry Research* 62, 21–32.
- de Haas, Y., Windig, J.J., Calus, M.P.L., Dijkstra, J., de Haan, M., Bannink, A., Veerkamp, R.F., 2011. Genetic parameters for predicted methane production and potential for reducing enteric emissions through genomic selection. *Journal of Dairy Science* 94, 6122–6134. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4439>
- Delgado, J.A., Follett, R.F., 2010. Advances in nitrogen management for water quality. *Soil and Water Conservation Society.* 1–424.
- Demo-os, R.A., Valdez, M.T.SJ., Mapili, M.C., 2000. Feeding value of corn-stover-swine waste silage for beef cattle. *Jr (Tarlac Coll. of Agriculture, Camiling, Tarlac (Philippines). Dept. of Animal Science)* 26, 169-174 pp.
- Denman, Brasseur, G., Chidthaisong, A., Ciais, P., Cox, P.M., Dickinson, R.E., Hauglustaine, D., Heinze, C., Holland, E., Jacob, D., 2007. Couplings between changes in the climate system and biogeochemistry. *The Physical Science Basis* 499–587.
- DeRamus, A.H., Terry, C.C., Dean, D.G., Peter, C.D., 2003. Methane Emissions of Beef Cattle on Forages: Efficiency of Grazing Management Systems. *J. Environ. Qual* 32.
- Díaz-Monroy, B.L., Castañeda-Caguana, S.I., 2014. Efecto in vitro de preparados con levaduras sobre la producción de metano ruminal. *CIENCIA Y AGRICULTURA* 11, 39. <https://doi.org/10.19053/01228420.3836>

- Dini, Y., Gere, J., Briano, C., Manetti, M., Juliarena, P., Picasso, V., Gratton, R., Astigarraga, L., 2012. Methane Emission and Milk Production of Dairy Cows Grazing Pastures Rich in Legumes or Rich in Grasses in Uruguay. *Animals* 2, 288–300. <https://doi.org/10.3390/ani2020288>
- Durand, M., Kawashima, R., 1980. Influence of minerals in rumen microbial digestion, in: Ruckebusch, Y., Thivend, P. (Eds.), *Digestive Physiology and Metabolism in Ruminants*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 375–408. https://doi.org/10.1007/978-94-011-8067-2_18
- Ellis, J.L., Dijkstra, J., France, J., Parsons, A.J., Edwards, G.R., Rasmussen, S., Kebreab, E., Bnnikll, A., 2012. Effect of high-sugar grasses on methane emissions simulated using a dynamic model. *J. Dairy Sci.* 95, 272–285.
- Erisman, J.W., Sutton, M.A., Galloway, J., Klimont, Z., Winiwarter, W., 2008. How a century of ammonia synthesis changed the world. *Nature Geoscience* 1, 636.
- Erwin, E.S., MARCO, G.J., EMERY, E.M., 1961. Volatile Fatty Acid Analyses of Blood and Rumen Fluid by Gas Chromatography. *Journal of Dairy Science* 44, 1768–1771.
- Eun, J.-S., Fellner, V., Burns, J.C., Gumpertz, M.L., 2004. Fermentation of eastern gamagrass (*Tripsacum dactyloides* [L.] L.) by mixed cultures of ruminal microorganisms with or without supplemental corn¹. *Journal of Animal Science* 82, 170–178. <https://doi.org/10.2527/2004.821170x>
- FAO, 2013. Organización de la Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. *Combatir el clima a través del ganado: una evaluación global de las emisiones y oportunidades de las emisiones y oportunidades de mitigación*.
- FAOSTAT, 2016. FAOSTAT Emission Database, Agriculture Total.
- Flückiger, J., Blunier, T., Stauffer, B., Chappellaz, J., Spahni, R., Kawamura, K., Schwander, J., Stocker, T.F., Dahl-Jensen, D., 2004. N₂O and CH₄ variations during the last glacial epoch: Insight into global processes: N₂O AND CH₄ VARIATIONS DURING THE LAST GLACIAL EPOCH. *Global Biogeochemical Cycles* 18, n/a-n/a. <https://doi.org/10.1029/2003GB002122>
- Friedan, D., 1980. Nonlinear Models in ϵ Dimensions. *Phys. Rev. Lett.* 45, 1057–1060. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.45.1057>

- Galloway, J.N., Aber, J.D., Erisma, J.W., Seitzinger, S.P., Howarth, R.H., Cowling, E.B., Cosby, B.J., 2003. The nitrogen cascade. *BioScience* 341–356.
- Gere, J.I., Gratton, R., 2010. SIMPLE, LOW-COST FLOW CONTROLLERS FOR TIME AVERAGED ATMOSPHERIC SAMPLING AND OTHER APPLICATIONS. *Latin American Applied Research* 5.
- Gould, L., Kendall, N.R., 2011. Role of the rumen in copper and thiomolybdate absorption. *Nutrition Research Reviews* 24, 176–182. <https://doi.org/10.1017/S0954422411000059>
- Grainger, C., Williams, R., Eckard, R.J., Hannah, M.C., 2010. A high dose of monensin does not reduce methane emissions of dairy cows offered pasture supplemented with grain. *Journal of Dairy Science* 93, 5300–5308. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3154>
- Guglielmelli, A., Calabro, S., Primi, R., Carone, F., Cutrignelli, M.I., Tudisco, R., Piccolo, G., Ronchi, B., Danieli, P.P., 2011. In vitro fermentation patterns and methane production of sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) hay with different condensed tannin contents: In vitro fermentation, methane production and tannin content of sainfoin. *Grass and Forage Science* 66, 488–500. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2494.2011.00805.x>
- Hergarty, R., 1999a. Mechanisms for competitively reducing ruminal methanogenesis. *Australian Journal of Agricultural Research* 50, 1299–1305.
- Hergarty, R., 1999b. Reducing rumen methane emissions through elimination of rumen protozoa. *Australian Journal of Agricultural Research* 50, 1321–1328.
- Hernandez, S.D., Cervantes, G.D., Ramirez, B.J.F., Cobos, P.M., Pinto, R.R., Cruz, M.R.G., Astigarraga, F.M.L., 2016. High levels of copper sulphate on ruminal fermentation and methane production in a batch culture incubation.
- Hernández-Sánchez, D., Cervantes-Gómez, D., Ramírez-Bribiesca, J.E., Cobos-Peralta, M., Pinto-Ruiz, R., Astigarraga, L., Gere, J.I., 2019. The influence of copper levels on *in vitro* ruminal fermentation, bacterial growth and methane production: Influence of Cu on *in vitro* ruminal fermentation. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 99, 1073–1077. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9274>

- Hess, H.D., Monsalve, L.M., Lascano, C.E., Carulla, J.E., Díaz, T.E., Kreuzer, M., 2003. Supplementation of a tropical grass diet with forage legumes and *Sapindus saponaria* fruits: Effects on in vitro ruminal nitrogen turnover and methanogenesis. *Australian Journal of Agricultural Research* 54, 703–713.
- Holtshausen, L., Chaves, A., Beauchemin, K., Mcginn, S., Mcallister, T., Odongo, N., Cheeke, P., Benchaar, C., 2009. Feeding saponin-containing *Yucca schidigera* and *Quillaja saponaria* to decrease enteric methane production in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 92, 2809–2821.
- IPCC., 2013. Carbono y otros ciclos biogeoquímicos. En: *Cambio Climático 2013. La Base de la Ciencia Física. Contribución del grupo de trabajo I al quinto informe de evaluación del papel intergubernamental sobre cambio climático*. Cambridge.
- IPCC, 2006. *Guidelines for National Greenhouse Gas Inventories*.
- Jensen, B.B., 1996. Methanogenesis in monogastric animals. *Environmental Monitoring and Assessment* 42, 99–112. <https://doi.org/10.1007/BF00394044>
- Johnson, D.E., Johnson, K.A., Ward, G.M., Branine, M.E., 2000. *Ruminants and other animals*. Springer.
- Johnson, K., Huyler, M., Westberg, H., Lamb, B., Zimmerman, P., 1994. Measurement of methane emissions from ruminant livestock using a sulfur hexafluoride tracer technique. *Environmental Science & Technology* 28, 359–362.
- Johnson, K.A., Huyler, M., Westberg, H., Lamb, B., Zimmerman, P., 1994. Measurement of methane emissions from ruminant livestock using SF₆ tracer technique. *Environmental Science Technology* 28, 539–362.
- Johnson, K. A., Johnson, D.E., 1995. Methane emissions from cattle. *Journal of Animal Science* 73, 2483–2492. <https://doi.org/10.2527/1995.7382483x>
- Johnson, Kristen A., Johnson, D.E., 1995. Methane emissions from cattle. *Journal of animal science* 73, 2483–2492.
- Judd, M.J., Kellier, F.M., Ulyatt, M.J., Lassey, K.R., Tate, K.R., Shelton, I.D., Harvey, M.J., Walker, C.F., 1999. Net methane emissions from grazing sheep. *Global Change Biology* 5, 647–657.

- Kumar, S., Choudhury, P.K., Carro, M.D., Griffith, G.W., Dagar, S.S., Puniya, M., Calabro, S., Ravella, S.R., Dhewa, T., Upadhyay, R.C., Sirohi, S.K., Kundu, S.S., Wanapat, M., Puniya, A.K., 2014. New aspects and strategies for methane mitigation from ruminants. *Applied Microbiology and Biotechnology* 98, 31–44. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5365-0>
- Lasseby, K.R., Walker, C.F., McMillan, A.M.S., Ulyatt, M.J., 2001. On the performance of SF 6 permeation tubes used in determining methane emission from grazing livestock. *Chemosphere-Global Change Science* 3, 367–376.
- Lazzarini, Í., Detmann, E., Filho, S. de C.V., Paulino, M.F., Batista, E.D., Rufino, L.M. de A., Reis, W.L.S. dos, Franco, M. de O., 2015. Nutritional Performance of Cattle Grazing during Rainy Season with Nitrogen and Starch Supplementation. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 29, 1120–1128. <https://doi.org/10.5713/ajas.15.0514>
- Leip, A., Billen, G., Garnier, J., Grizzetti, B., Lassaletta, L., Reis, S., Simpson, D., Sutton, M.A., de Vries, W., Weiss, F., Westhoek, H., 2015. Impacts of European livestock production: nitrogen, sulphur, phosphorus and greenhouse gas emissions, land-use, water eutrophication and biodiversity. *Environmental Research Letters* 10, 115004. <https://doi.org/10.1088/1748-9326/10/11/115004>
- Li, F., Cheng, S., Yu, H., Yang, D., 2016. Waste from livestock and poultry breeding and its potential assessment of biogas energy in rural China. *Journal of Cleaner Production* 126, 451–460. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2016.02.104>
- Li, X., Liu, C., Chen, Y., Shi, R., Cheng, Z., Dong, H., 2017. Effects of mineral salt supplement on enteric methane emissions, ruminal fermentation and methanogen community of lactating cows: Effects of Mineral Salt on CH₄ Emission. *Animal Science Journal* 88, 1049–1057. <https://doi.org/10.1111/asj.12738>
- Lila, Z.A., Mohammed, N., Kanda, S., Kamada, T., Itabashi, H., 2003. Effect of Sarsaponin on Ruminal Fermentation with Particular Reference to Methane Production in Vitro. *Journal of Dairy Science* 86, 3330–3336. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73935-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73935-6)

- Lovett, D.K., Bortolozzo, A., Conaghan, P., O'Kiely, P., O'Mara, F.P., 2004. In vitro total and methane gas production as influenced by rate of nitrogen application, season of harvest and perennial ryegrass cultivar. *Grass Forage Science* 59, 227–232.
- Maiss, M., Steele, L.P., Francey, R.G., Fraser, P.J., Langenfelds, R.L., Trivett, N.B.A., Levin, N., 1996. Sulfur hexafluoride-A powerful new atmospheric tracer. *Atmospheric Environment* 30, 1621–1629.
- Mallin, M.A., McIver, M.R., Robuck, A.R., Dickens, A.K., 2015. Industrial Swine and Poultry Production Causes Chronic Nutrient and Fecal Microbial Stream Pollution. *Water, Air, & Soil Pollution* 226. <https://doi.org/10.1007/s11270-015-2669-y>
- Martin, C., Morgavi, D.P., Doreau, M., 2010. Methane mitigation in ruminants: from microbe to the farm scale. *Animal* 351–365. <https://doi.org/10.1017/S1751731109990620>
- Mbanzamiho, L., Fievez, V., Da Costa Gómez, C., Piattoni, F., Carlier, L., Demeyer, D., 2001. Methane emissions from the rumen of sheep fed a mixed grass-clover pasture at two fertilisation rates in early and late season. *Canadian Journal of animal science* 92, 69–77.
- Mc Geough, E.J., O'Kiely, P., Hart, K.J., Moloney, A.P., Boland, T.M., Kenny, D.A., 2010. Methane emissions, feed intake, performance, digestibility, and rumen fermentation of finishing beef cattle offered whole-crop wheat silages differing in grain content¹. *Journal of Animal Science* 88, 2703–2716. <https://doi.org/10.2527/jas.2009-2750>
- McCaughey, W.P., Wittenberg, K., Corrigan, D., 1997. Methane production by steers on pasture. *Canadian Journal of Animal Science* 77, 519–524.
- Meinshausen, M., Meinshausen, N., Hare, W., Raper, S.C.B., Frieler, K., Knutti, R., Frame, D.J., Allen, M.R., 2009. Greenhouse-gas emission targets for limiting global warming to 2 °C. *Nature* 458, 1158–1162. <https://doi.org/10.1038/nature08017>

- Mieres, J., Olivera, L., La Manna, A., Fernández, E., Palermo, R., Gremminger, H., 2002. Methane emissions from holstein heifers grazin contrastig pastures in Uruguay.
- Montzka, S.A., Dlugokencky, E.J., Butler, J.H., 2011. Non-CO2 greenhouse gases and climate change. *Nature* 476, 43.
- Moss, A.R., Jouany, J.-P., Newbold, J., 2000. Methane production by ruminants: its contribution to global warming. *Annales de Zootechnie* 49, 231–253. <https://doi.org/10.1051/animres:2000119>
- Muñoz, L.I.O., 2001. NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-062-ZOO-1999, ESPECIFICACIONES TECNICAS PARA LA PRODUCCION, CUIDADO Y USO DE LOS ANIMALES DE LABORATORIO. 59.
- NASEM, 2016. National Academies of Science, Engineering, and Medicine (NASEM). Nutrient Requirements of Beef CATTLE, 8 th reviced. ed. The National Academies press, Washington, DC.
- Navarro-Villa, A., O'Brien, M., López, S., Boland, T.M., O'Kiely, P., 2011. In vitro rumen methane output of red clover and perennial ryegrass assayed using the gas production technique (GPT). *Animal Feed Science Technology* 168, 152–164. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2011.04.091>
- NRC., 2001. National Research Council, Washington, DC., USA. National Academy Press. ed.
- Odongo, N.E., Bagg, R., Vessie, G., Dick, P., Or-Rashid, M.M., Hook, S.E., Gray, J.T., Kebreab, E., France, J., McBride, B.W., 2007. Long-Term Effects of Feeding Monensin on Methane Production in Lactating Dairy Cows. *Journal of Dairy Science* 90, 1781–1788. <https://doi.org/10.3168/jds.2006-708>
- Oltjen, R.R., Sirny, R.J., Tillman, A.D., 1962. Effects of B Vitamins and Mineral Mixtures upon Growth and Rumen Function of Ruminants Fed Purified Diets1-2 9.
- Patra, A.K., Kamra, D.N., Agarwal, N., 2006. Effect of plant extracts on in vitro methanogenesis, enzyme activities and fermentation of feed in rumen liquor of buffalo. *Animal Feed Science and Technology* 128, 276–291. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2005.11.001>

- Paustian, K., J. Six, E. T. Elliott, H. W. Hunt, 2000. Management options for reducing CO₂ emissions from agricultural soils. *Biogeochemistry* 48, 147–163.
- Pedreira, M. dos S., Primavesi, O., Lima, M.A., Frighetto, R., Oliveira, S.G. de, Berchielli, T.T., 2009. Ruminant methane emission by dairy cattle in Southeast Brazil. *Scientia Agricola* 66, 742–750.
- Piñares-Patiño, C.S., D' Hour, P., Jouany, J.P., Martin, C., 2007. Effects of stocking rate on methane and carbon dioxide emissions from grazing cattle. *Agr Ecosystem Environ* 121, 20–46.
- Piñeiro-Vázquez, A., Canul Solis, J.R., Casanova Lugo, F., Chay-Canul, A.J., Ayala-Burgos, A.J., Solorio-Sánchez, F.J., Aguilar-Pérez, C.F., Ku-Vera, J.C., 2017. Emisión de metano en ovinos alimentados con *Pennisetum purpureum* y árboles que contienen taninos condensados. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias* 8, 111. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v8i2.4401>
- Pino, F., Heinrichs, A.J., 2016. Effect of trace minerals and starch on digestibility and rumen fermentation in diets for dairy heifers. *Journal of Dairy Science* 99, 2797–2810. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10034>
- Power, A.G., 2010. Ecosystem services and agriculture: tradeoffs and synergies. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 365, 2959–2971. <https://doi.org/10.1098/rstb.2010.0143>
- Rabiansky, P.A., McDowell, L.R., Velasquez-Pereira, J., Wilkinson, N.S., Percival, S.S., Martin, F.G., Bates, D.B., Johnson, A.B., Batra, T.R., Salgado-Madriz, E., 1999. Evaluating Copper Lysine and Copper Sulfate Sources for Heifers. *Journal of Dairy Science* 82, 2642–2650. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(99\)75521-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(99)75521-9)
- Ramankutty, N., Mehrabi, Z., Waha, K., Jarvis, L., Kremen, C., Herrero, M., Rieseberg, L.H., 2018. Trends in Global Agricultural Land Use: Implications for Environmental Health and Food Security. *Annual Review of Plant Biology* 69, 789–815. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042817-040256>
- Ramírez, J.F., Posada, O.S., Noguera, R., 2014. Metanogénesis ruminal y estrategias para su mitigación. *Rev CES Med Zootec* 9, 307–323.

- Relling, A.E., Mattioli, G.A., 2003. Fisiología digestiva y metabólica de los rumiantes. Argentina: UNLP Editorial Edulp 23–55.
- Santacoloma Varón, L.E., 2011. Las dietas en las emisiones de metano durante el proceso de rumia en sistemas de producción bovina. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental* 2, 55. <https://doi.org/10.22490/21456453.913>
- Santillán, V.S., Barra, J.D.E., Pellat, F.P., Cárdenas, L.O.A., 2016. EMISIONES DE GASES DE EFECTO INVERNADERO EN SISTEMAS AGRÍCOLAS DE MÉXICO 14.
- Sauerbeck, D. R., 2001. Nutrient Cycling in Agroecosystems 60, 253–266.
- Scaringelli, F.P., O’Keeffe, A.E., Rosenberg, E., Bell, J.P., 1970. Preparation of known concentrations of gases and vapors with permeation devices calibrated gravimetrically. *Analytical Chemistry* 42, 871–876.
- Smith, P., Martino, D., Cai, Z., Gwary, D., Janzen, H., Kumar, P., McCarl, B., Ogle, S., O’Mara, F., Rice, C., Scholes, B., Sirotenko, O., Howden, M., McAllister, T., Pan, G., Romanenkov, V., Schneider, U., Towprayoon, S., Wattenbach, M., Smith, J., 2008. Greenhouse gas mitigation in agriculture. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 363, 789–813. <https://doi.org/10.1098/rstb.2007.2184>
- Snyder, S.C., Bruulsema, T.W., Jensen, T.L., Fixen, P.E., 2009. Review of greenhouse gas emissions from crop production systems and fertilizer management effects 133, 247–266.
- Spears, J.W., 2003. Trace Mineral Bioavailability in Ruminants. *The Journal of Nutrition* 133, 1506S-1509S. <https://doi.org/10.1093/jn/133.5.1506S>
- Spears, J.W., 1996. Organic trace minerals in ruminant nutrition. *Animal Feed Science and Technology* 58, 151–163. [https://doi.org/10.1016/0377-8401\(95\)00881-0](https://doi.org/10.1016/0377-8401(95)00881-0)
- Steinfeld, H., Gerber, P., Wassenaar, T., Castel, T., Rosales, M., De Haan, 2009. *Livestock’s long shadow: Envirometal Issues and Options.*
- Sukul, P., Lamshöft, M., Kusari, S., Zühlke, S., Spiteller, M., 2009. Metabolism and excretion kinetics of ¹⁴C-labeled and non-labeled difloxacin in pigs after oral administration, and antimicrobial activity of manure containing difloxacin and its

- metabolites. *Environmental Research* 109, 225–231.
<https://doi.org/10.1016/j.envres.2008.12.007>
- Sun, X.Z., Waghom, G.C., Clark, H., 2010. Cultivar and age of regrowth effects on physical, chemical and in sacco degradation kinetics of vegetative perennial ryegrass (*Lolium perenne* L). *Animal Feed Science Technology* 155, 172–185.
- Suttle, N.F., Peter, D.W., 1985. Rumen sulphide metabolism as a major determinant of the availability of copper to ruminants. In: Mills, C. F., I. Bremner, and J.K. Chester (eds). *Proc. Fifth Int. Symp. on Trace Element In Man and Animals: Commonwealth Agricultural Bureaux, Faenham Royal, UK.* 367-370 pp.
- Sutton, M.A., Oenema, O., Erisman, J.W., Leip, A., van Grinsven, H., Winiwarter, W., 2011. Too much of a good thing. *Nature* 472, 159.
- Swainson, N.M., Brookes, I.M., Hoskin, S.O., Clark, H., 2011. Post-experiment correction for release rate in permeation tubes improves the accuracy of the sulphur hexafluoride (SF₆) tracer technique in deer. *Animal Feed Science and Technology* 166–167, 192–197.
<https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2011.04.010>
- Tang, L.C., 1978. Determination of Iron and Copper in 18th and 19th Century Books by Flameless Atomic Absorption Spectroscopy. *Journal of the American Institute for Conservation* 17, 19–32. <https://doi.org/10.1179/019713678806029193>
- Ulyatt, M.J., Lassey, K.R., Shelton, I.D., Walker, C.F., 2002. Seasonal variation in methane emission from dairy cows and breeding ewes grazing ryegrass/white clover pasture in New Zealand. *New Zealand Journal of Agricultural Research* 45, 217–226. <https://doi.org/10.1080/00288233.2002.9513512>
- Underwood, E.J., Suttle, N.F., 1999. *The mineral nutrition of livestock*, 3 rd. ed. Moredun Research Institute.
- Ushida, K., Miyazaki, A., Kawashima, R., 1986. Effect of defaunation on ruminal gas and VFA production in vitro. *Japan Journal Zootech Science* 71–77.
- Valdez, F.R., Bush, L.J., Goetsch, A.L., Owens, F.N., 1986. Effect of Steroidal Sapogenins on Ruminant Fermentation and on Production of Lactating Dairy Cows. *Journal of Dairy Science* 69, 1568–1575.
[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(86\)80573-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(86)80573-2)

- Van Keulen, J., Young, B.A., 1977. Evaluation of Acid-Insoluble Ash as a Natural Marker in Ruminant Digestibility Studies. *Journal of Animal Science* 44, 282–287. <https://doi.org/10.2527/jas1977.442282x>
- Van Vugt, S., Waghorn, G., Clark, D., Woodward, S., 2005. Impact of monensin on methane production and performance of cows fed forage diets. *New Zealand Society of Animal Production* 65, 362–366.
- van Zijderveld, S.M., Dijkstra, J., Perdok, H.B., Newbold, J.R., Gerrits, W.J.J., 2011. Dietary inclusion of diallyl disulfide, yucca powder, calcium fumarate, an extruded linseed product, or medium-chain fatty acids does not affect methane production in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 94, 3094–3104. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-4042>
- Vargas, J., Cárdenas, E., Pabón, M., Carulla, J., 2012. Emisión de metano entérico en rumiantes en pastoreo. *Arch. Zoootec.* 61.
- Weathers, Strayer, D.L., Likens, G.E., 2013. , in: *Fundamentals of Ecosystem Science*. Elsevier, pp. i–iii. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-091680-4.00018-4>
- Westberg, H., Lamb, B., Johnson, K.A., Huyler, M., 2001. Inventory of methane emissions from U.S. cattle. *Journal of Geophysical Research: Atmospheres* 106, 12633–12642. <https://doi.org/10.1029/2000JD900808>
- Will, M., Lässig, J., Tasche, D., Heider, J., 2014. Regional Carbon Footprinting for Municipalities and Cities 8.
- Wittenberg, K.M., 2008. Enteric methane emissions and mitigation opportunities for Canadian cattle production systems. University of Manitoba, Winnipeg.
- Yan, T., Mayne, C.S., Gordon, F.G., Porter, M.G., Agnew, R.E., Patterson, D.C., Ferris, C.P., Kilpatrick, D.J., 2010. Mitigation of enteric methane emissions through improving efficiency of energy utilization and productivity in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 93, 2630–2638. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2929>