

CENTRO INTERNACIONAL DE ALTOS ESTUDIOS AGRONÓMICOS
MEDITERRÁNEOS

INSTITUTO AGRONÓMICO MEDITERRÁNEO DE ZARAGOZA

**EVALUACIÓN DE PARÁMETROS DE FERMENTACIÓN RUMINAL Y
EMISIONES DE METANO EN RACIONES REPRESENTATIVAS DE
DIFERENTES SISTEMAS DE PRODUCCIÓN DE OVINO LECHERO EN LA
COMUNIDAD AUTÓNOMA DEL PAÍS VASCO**

El presente trabajo de investigación es un requisito
para obtener el grado académico de Máster of Science
en Nutrición Animal

Carolina PINEDA QUIROGA

Este trabajo fue realizado en el Departamento de Producción Animal del Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario NEIKER-Tecnalia bajo la supervisión de los **Drs. Roberto Ruíz Santos y Aser García Rodríguez**

AGRADECIMIENTOS

Al Departamento de Producción Animal del Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario, Neiker-Tecnalia por la oportunidad de vincularme con ellos.

A Roberto Ruíz Santos por su gran apoyo durante toda la estancia de investigación en el Departamento de Producción Animal, por su orientación y acompañamiento constante en el desarrollo del trabajo de investigación.

A Aser García Rodríguez por su orientación permanente en el desarrollo del trabajo de investigación, por su enorme contribución en mi formación profesional y personal y por su continuo respaldo.

A Nerea Mandaluniz por su incondicionalidad y voluntad de ayuda en todo lo necesario durante la ejecución del trabajo, por la confianza y por la oportunidad de establecer un agradable vínculo de amistad.

A mi familia por creer en mí, por su apoyo incondicional. A mis padres por acompañarme cada día y en todo momento a pesar de la distancia. A mi madre por ser mi gran motivación, mi alegría, por sus palabras oportunas y llenas de afecto cada vez que fueron necesarias, a mi padre por ser el mejor que maestro tengo, por su palabra precisa, clara y siempre llena de razón; a ellos dos por enseñarme siempre que todo lo que se hace bien desde el principio, ahorra la incertidumbre y las dudas de lo que pueda venir. Para ellos que lo merecen todo, este y todos los demás triunfos que vendrán.

“De la lengua maya se aprende que no hay jerarquía que separe el sujeto del objeto, porque yo bebo el agua que me bebe y soy mirado por todo lo que mire... y se aprende a saludar así: - Yo soy tu. – Tu eres otro yo”. Eduardo Galeano.

La ejecución de este trabajo de investigación ha sido llevada a cabo en el marco del proyecto RTA-2011-00133-C02-01 financiado por el Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria INIA.

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue: i) Evaluar *in vitro* los parámetros de fermentación ruminal, la digestibilidad y emisiones de metano de las dietas empleadas en explotaciones de ovino lechero con diferente nivel de intensificación y representativas de los principales sistemas de producción existentes en la Comunidad Autónoma del País Vasco (CAPV); ii) así como proponer estrategias de mitigación de emisiones de metano para este sistema ganadero. Se monitorizaron y caracterizaron 16 rebaños en fase de parto y 14 rebaños al inicio de lactación. Para cada caso, mediante encuesta a los pastores se identificaron características de raza empleada, manejo nutricional y tipo de forraje suministrado. Se tomaron muestras individuales de los ingredientes que conformaron las raciones suministradas en cada uno de los rebaños para realizar el análisis químico laboratorial, calcular el aporte nutricional de la ración total y realizar incubaciones *in vitro* para determinar parámetros de la cinética de producción de gas, digestibilidad, producción de ácidos grasos volátiles y de metano. La proporción media forraje/concentrado empleado en las raciones de parto fue de 70:30, siendo heno de pradera de diferente calidad el forraje suministrado en la mayoría de los rebaños. Las raciones de inicio de lactación emplearon una proporción media forraje/concentrado de 60:40, ofreciendo heno de pradera en la mitad de los rebaños en conjunto con otro tipo de forrajes. Las raciones de inicio de lactación presentaron con respecto a las de parto presentaron una menor producción potencial de gas (268,11 vs. 312,98 ml/g MOI, $P < 0,001$), menor producción de gas/día por gramo de materia orgánica incubada (159,87 vs. 169,23 ml/g, MOI, $P = 0,043$) y una mayor digestibilidad (64 vs. 59 g/100 g, $P = 0,005$); la eficiencia de los procesos fermentativos también fue mayor, siendo superiores el factor de partición a 24 horas (4,04 vs. 3,66 mg MO/ml, $P = 0,009$), la síntesis de biomasa microbiana a 24 horas (126,08 vs. 104,37 mg, $P = 0,010$) y la eficiencia de dicha síntesis microbiana a 24 horas (45 vs. 39 g/100g, $P = 0,002$), mientras que la producción de gas/día por gramo de materia orgánica fermentable (248,18 vs. 278,77 ml/g, $P < 0,001$) y el ratio ácido graso volátil : materia orgánica fermentable (17,33 vs. 19,84 mmol/g MOF, $P = 0,005$) fueron menores. Las diferencias dentro de las raciones de parto sólo se presentaron para el parámetro que describe el tiempo en el que se alcanza la mitad del valor

potencial de gas, siendo menor para la ración que empleó heno de alfalfa con un valor relativo forrajero de segunda como único aporte forrajero en una proporción forraje/concentrado 69/31 y un contenido en ración total de FND y FAD de 353 y 276 g/kg respectivamente, con respecto a 9 raciones con proporciones similares donde en uno de los casos el único componente forrajero fue paja de cereal y para el resto fue heno de pradera de diferente calidad. El promedio de producción de metano/día por gramo de materia orgánica fermentable e incubada en las raciones de parto fue de 5,97 mmol y 3,56 mmol y en inicio de lactación de 5,65 mmol y 3,57 mmol respectivamente. De las raciones de lactación temprana, aquella que menos producción de metano presentó, empleó heno de alfalfa y de pradera con un valor relativo forrajero excelente en una proporción forraje/concentrado 72/28 y un contenido en ración total de FND y FAD de 267 y 198 g/kg respectivamente, en sentido opuesto con una ración 50/50 que empleó heno de alfalfa y ensilaje de maíz con un valor relativo forrajero de primera y un contenido de FND y FAD de 404 y 253 g/kg respectivamente. De esta parte se concluye que existe una amplia variabilidad en el manejo alimenticio en los dos estados fisiológicos monitorizados, que repercutió de igual forma en la variabilidad observada dentro de las raciones de cada estado fisiológico, así como en la observada en la comparación entre estados fisiológicos. Las estrategias de mitigación evaluadas en laboratorio consideraron la inclusión de distintas fuentes de grasa en la dieta, diferentes niveles de inclusión en la ración y henos de diferente calidad. Se realizó un diseño multifactorial con 2 henos de diferente calidad (alta y baja) x 3 tipos de grasa (torta de girasol, de colza y grasa de palma) x 2 niveles de grasa en ración total (3% y 5%). Se realizaron incubaciones *in vitro* para determinar los parámetros de la cinética de producción de gas, digestibilidad de la materia orgánica, producción de AGV'S y producción de metano. La interacción entre la calidad del heno y el nivel de grasa redujo la emisión de gas por gramo de materia orgánica fermentable (275,87 vs. 236,55 ml/g MOF, P=0,001), la proporción de ácido acético (0,71 vs. 0,69 g/g del total de AGV, P=0,030), el ratio ácido acético/propiónico (4,06 vs. 3,94, P=0,040) y la producción de metano por gramo de materia orgánica fermentable (5,98 vs. 4,44 mmol día, P=0,006) en la incubación del heno de alta calidad y un nivel de grasa del 5%. De otro modo, la interacción entre el tipo de grasa y la calidad del heno afectó la digestibilidad *in vitro* de la

materia orgánica, siendo mayor para el heno de alta calidad cuando se incubó con torta de colza (64 g/100g vs. 51 g/100g, $P=0,001$), torta de girasol (64 g/100g vs. 50 g/100g, $P=0,001$) y grasa de palma (65 g/100g vs. 47 g/100g, $P=0,001$). El efecto simple de incubar con torta de girasol redujo la producción de gas por g/materia orgánica incubada con respecto a la torta de colza (142,30 vs. 149,90, $p=0,003$). Del mismo modo, la torta de girasol incrementó el factor de partición a 24 horas (4,03 vs. 3,78 mg MO/ml, $P=0,035$) y la síntesis de biomasa microbiana a 24 horas (105,56 mg vs. 93,08, $P=0,049$) con respecto a las raciones con grasa de palma. El heno de alta calidad en relación con el de baja redujo la producción potencial de gas (258,17 vs. 308,83 ml/g MO, $P<0,001$), incrementó el factor de partición a 24 horas (4,06 vs. 3,71 mg MO/ml, $P=0,003$), la síntesis de biomasa microbiana a 24 horas (119,74 vs. 80,20 mg, $P<0,001$) y la eficiencia de síntesis microbiana a 24 horas (46 vs. 41 g/100g, $P<0,001$ respectivamente), y redujo el ratio ácido graso volátil : materia orgánica fermentable (20,94 vs. 25,25 mmol/g MOF, $P=0,002$). Desde el punto de vista de la mitigación de emisión de metano se concluye que la combinación de un heno de alta calidad de características composicionales como las del incubado en este ensayo, con un nivel de grasa del 5% en la ración, reduce la emisión de gas diaria y de metano por gramo de materia. Por su parte, la producción potencial de gas se redujo al incubar con un heno de alta calidad con respecto al de baja.

ABSTRACT

The aim of this research was to evaluate *in vitro* the parameters of ruminal fermentation, digestibility and methane emissions in diets employed in dairy sheep flocks with different intensification level in the Autonomous Community of the Basque Country, as well as to propose mitigation strategies of methane emissions. A sample of 16 flocks were monitored during the prepartum stage and 14 flocks in early lactation. Information was gathered through a survey to the shepherds, and the flocks were characterized according to the characteristics of the breed employed, feeding management practices and the type of forage used. Individual samples of every ingredient of the diets provided were collected to assess the chemical analysis, to calculate the nutritional value of the total rations and to carry out *in vitro* incubations of the diets to determinate the kinetics parameters of gas production, digestibility, volatile fatty acids and methane production. The forage/concentrate ratio supplied in the prepartum rations was 70:30 and 60:40 in early lactation. Grass hay was the forage more frequently used, and during early lactation half of the flocks also provided another additional forage. Shepherds usually reserve the best quality forages for lactation. In comparison to the diets provided at the end of pregnancy, the early lactation rations produced significantly less potential gas production (268.11 vs. 312.98 ml/g IOM, $P < 0.001$), lower daily gas production per g/incubated organic matter (159.87 vs. 169.23 ml/g IOM) and higher digestibility (64 vs. 59 g/100 g, $P = 0.005$); the fermentative ruminal process were higher, so were higher the partitioning factor at 24 hours (4.04 vs. 3.66 mg OM/ml, $P = 0.009$), microbial biomass synthesis at 24 hours (126.08 vs. 104.37 mg, $P = 0.010$) and efficiency microbial synthesis at 24 hours (45 vs. 39 g/100g, $P = 0.002$), while the daily gas production/g fermentable organic matter (248.19 vs. 278.77 ml/g, $P < 0.001$) and volatile fatty acid: fermentable organic matter was lower (17.33 vs. 19.84 mmol/g FOM, $P = 0.005$). The differences within the rations provided in late pregnancy were only significantly different for the parameter the describes the time to reach the half of the value of potential gas production. The lowest value corresponded to the ration number 15, which used lucerne hay of second category according to the forage relative as the unique forage

component in the ratio forage:concentrate 69/31, in comparison to 9 rations with similar proportion of forage:concentrate, which usually provided grass hay of different quality features as the only forage source, and in one flock sheep were also offered cereal straw. Daily average methane production for the feed rations at the end of pregnancy 5.97 mmol per g of fermentable organic matter and 3.56 mmol per g of incubated organic matter, whereas, in early lactation ratios they were 5.65 mmol and 3.57 mmol respectively. The lowest methane production in early lactations rations was recorded for one that used lucerne and grass hay with excellent quality value, in a 72/28 forage/concentrate and a content of 267 g/kg NDF and 198g/kg ADF. On the contrary, the highest methane production was observed for a diet containing lucerne hay and corn silage a relative forage value of first quality in a 50/50 forage:concentrate and a content of 404 g/kg and 253 g/kg ADF. Therefore, a wide variability in the features of the rations provided in the two physiological stages monitored, which exert an impact on *in vitro* methane production. The mitigation strategies evaluated in laboratory considered the inclusion of fat from different sources and at different inclusion levels within the diet, as wells as the utilization of grass hays of different quality. A multifactorial trial was designed comprising 3 fat sources (sunflower cake, rapeseed cake and palm fat), 2 levels of inclusion of fat in the total ration (3% and 5%) and 2 hays with different quality features (high vs. low). *In vitro* incubations were carried out to assess the degradation kinetics, gas production parameters, digestibility, volatile fatty acids and methane production. The quality hay and fat level interaction reduced daily gas emission per g/fermentable organic matter (275.87 vs. 236.55 ml/g MOF, P=0.001), acetic acid proportion (0.71 vs. 0.69 g/g of total VFA, P=0.030), acetic acid/propionic acid ratio (4,06 vs. 3,94, P=0,040) and methane production per g/fermentable organic matter (5.98 vs. 4.44 mmol day, P=0.006) in high quality hay and 5% fat level incubation. Fat sources and quality hay interaction affected the digestibility, which was significantly higher for incubations containing high quality hay with rapeseed cake (64 vs. 51 g/100g, P=0.001), sunflower cake (64 vs. 50 g/100g, P=0.001) and palm fat (65 vs. 47 g/100g, P=0.001), in comparison to low quality hay. The utilization of sunflower cake increased the partitioning factor at 24 hours (4.03 vs. 3.78 mg MO/ml, P=0.035) and microbial biomass synthesis at 24 hours (105.56 mg vs. 93.08, P=0,049) in comparison

with rations incubated with palm fat. The high quality hay reduced potential gas production (258.17 vs. 308.83 ml/g IOM) increased partitioning factor at 24 hours (4.06 vs. 3.71 mg MO/ml, $P=0.003$), microbial biomass synthesis at 24 hours (119.74 vs. 80.20 mg, $P<0,001$) and the synthesis microbial efficiency at 24 hours (46 vs. 41 g/100g, $P<0.001$ respectively), and reduced volatile fatty acid: fermentable organic matter ratio (20.94 vs. 25.25 mmol/g MOF, $P=0.002$), in comparison to low quality hay. Regarding mitigation of methane emission mitigation, the results obtained have shown the favorable effect of using better quality forages compared with low quality, as well as the inclusion of feedstuffs that increase the fat content of the ration. Whenever forage with the quality features similar to the high quality hay used in this research is provided, the utilization of a 5% fat level in the total ration helps to decrease significantly the methane emission per g/fermentable organic matter.

RESUMÉ

Les objectifs de cette étude étaient de: i) évaluer les paramètres *in vitro* de fermentation ruminale, la digestibilité et les émissions de méthane des régimes utilisés dans les élevages de moutons laitiers avec différents niveaux d'intensification, représentant les principaux systèmes de production dans la Communauté Pays Basque, ii) proposer des stratégies d'atténuation des émissions de méthane de ces systèmes d'élevage. 16 troupeaux ont été suivis et caractérisés durant la phase pré-partum et 14 troupeaux au début de la lactation. Pour chaque cas, les manipulations nutritionnelles et le type de fourrage fournis ont été définis à l'aide des enquêtes proposés aux agriculteurs, des échantillons individuels des ingrédients des rations ont été pris pour réaliser l'analyse chimique en laboratoire, calculer la contribution nutritionnelle de la ration totale et effectuer des incubations *in vitro* pour déterminer les paramètres cinétiques de production de gaz, la digestibilité, la production d'acides gras volatils et de méthane. Les rations de pré-partum ont été basées sur une relation moyenne fourrage:concentré 70:30, foin de prairie de différente de qualité distribué comme fourrage dans la plupart des troupeaux. Les rations de début de lactation ont été caractérisées par une relation moyenne fourrage:concentré 60:40, foin de prairie de différente de qualité distribué à la moitié des troupeaux à côté d'autres types de fourrages. Les rations de début de lactation ont présenté une production potentielle de gaz inférieure (268,11 vs. 312,98 ml/g MOI, $P < 0,001$), une production de gaz/jour et par gramme de matière organique incubé (159,87 vs. 169,23 ml/g, MOI, $P = 0,043$) mineure, une digestibilité plus élevée (64 vs. 59 g/100 g, $P = 0,005$), une l'efficacité du procédé de fermentation plus élevée, un facteur de partition supérieur (4,04 vs. 3,66 MO mg/ml, $P = 0,009$), une synthèse de biomasse microbienne (126,08 vs. 104,37 mg, $P = 0,010$) et une efficacité de synthèse microbienne à 24 heures (45 vs. 39 g/100g, $P = 0,002$) supérieures aux rations de pré-partum, tandis que la production de gaz/jour et par gramme de matière organique fermentescible (248.18 vs. 278.77 ml/g, $P < 0,001$) et le taux d'acides gras volatils: la matière organique fermentescible (17,33 vs. 19,84 mmol / g MOF, $P = 0,005$) étaient plus faibles. Les différences au sein des rations pré-partum ont été uniquement détectées au niveau du paramètre qui décrit le temps où s'atteint la moitié de la valeur

potentielle de gaz. Ce paramètre a été inférieur au niveau de la ration 15, caractérisée par l'usage du foin de luzerne de deuxième valeur comme fourrage, une proportion de concentré:fourrage 69:31 et une teneur totale de NDF et ADF de 353 et 276 g/kg, respectivement, en comparaison avec 9 rations ayant des proportions similaires, utilisant la paille de céréales comme fourrage dans l'une des rations et le foin de prairie de différente qualité dans le reste. La production moyenne de méthane/jour et par gramme de matière organique fermentescible et incubé dans les rations pré-partum était 5,97 mmol et 3,56 mmol, respectivement, et en début de lactation de 5,65 mmol et 3,57 mmol. Les rations de lactation précoce générant les mineurs productions de méthane, ont été basées sur le foin de luzerne et de prairie de haute valeur relative, une proportion fourrage:concentré de 72:28 et une teneur totale de NDF et ADF de 267 et 198 g/kg, respectivement, en comparaison avec les rations ayant une relation 50/50, le foin de luzerne et l'ensilage de maïs comme fourrage de première valeur et un contenu relatif NDF et ADF de 404 et 253 g/kg respectivement. A base de ces résultats on peut conclure qu'il existe une grande variabilité dans la manipulation des aliments dans les deux conditions physiologiques surveillés, qui a affecté de la même façon la variabilité observée au niveau des rations du même état physiologiques ainsi que celle observée lors de la comparaison entre états physiologiques. Les stratégies de mitigations évaluées dans le laboratoire ont considérés l'inclusion de différentes sources de matières grasses dans l'alimentation, des différents niveaux d'inclusion dans la ration et de qualités distinctes de foins. Un essai multifactoriel a été réalisé avec 2 différentes qualités de foin (haute et basse) x 3 types de matières grasses (tourteaux de tournesol, de colza et de graisse de palme) x 2 niveaux de lipides dans la ration totale (3% et 5%). Les incubations ont été réalisées *in vitro* pour déterminer les paramètres cinétiques de production de gaz, la digestibilité de la matière organique, la production d'AGV et la production de méthane. L'interaction entre la qualité de la paille et le niveau de graisse a réduit l'émission de gaz par gramme de matière organique fermentescible (275,87 vs. 236,55 ml/g MOF, P=0,001), la proportion de l'acide acétique (0,71 vs. 0,69 g/g d'acides gras volatils totaux, P=0,030), le rapport de l'acide acétique/acide propionique (4,06 vs. 3,94, P=0,040) et la production de méthane par gramme de matière organique fermentescible (5,98 vs. 4,44 mmol, P=0,006) dans

l'incubation de foin de haute qualité et un niveau de matières grasses de 5%. L'interaction entre le type de gras et la qualité du foin a affecté la digestibilité *in vitro* de la matière organique, étant plus élevé pour le foin de haute qualité lorsqu'il est incubé avec le tourteau de colza (64 g/100 g contre 51 g/100g, P=0,001), tourteau de tournesol (64 g/100 g vs. 50 g/100 g, P=0,001) et de grasse de palme (65 g/100 g vs. 47 g/100 g, P=0,001). Le simple effet de l'incubation avec tourteau de tournesol a réduit la production de gaz en g de matière organique incubée en comparaison avec le tourteau de colza (142,30 vs. 149,90, P= 0,003). Du même mode, le tourteau de tournesol a augmenté le facteur de partition (4,03 vs. 3,78 MO mg/ml, P=0,035) et la synthèse de la biomasse microbienne à 24 heures en comparaison avec grasse de palme (105,56 mg vs. 93,08, P=0,049). Le foin de haute qualité a réduit la production de gaz (258,17 vs. 308,83 ml/g OM, P<0,001), augmenté le facteur de partition (4,06 vs. 3,71 mgMO/ml, P=0,003) et la synthèse microbienne de la biomasse à 24 heures (119,74 vs. 80,20 mg, P<0,001) et l'efficacité de la synthèse microbienne à 24 heures (46 vs. 41 g/100g, P< 0,001), et a diminué le ratio acides gras volatils:g de matière organique fermentescible (20,94 vs. 25,25 mmol/g MOF, P=0,002). Du point de vue réduction du méthane, il est conclu que la combinaison foin de haute qualité, ayant les mêmes caractéristiques compositionnels de celui incubé dans cet essai, avec un niveau de 5 % de matière grasse dans le régime alimentaire, peut réduire l'émission journalière de gaz et de méthane par gramme de matière. La production potentielle de gaz a été diminuée durant son incubation avec le foin de haute qualité en comparaison avec celui de basse qualité.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	i
ABSTRACT	v
RESUMÉ	ix
ÍNDICE DE TABLAS	xxi
ÍNDICE DE FIGURAS	xxiii
ABREVIATURAS	xxv
1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVO	3
3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	5
3.1 <i>OVINO DE LECHE EN LA COMUNIDAD AUTÓNOMA DEL PAÍS VASCO</i>	5
3.2 <i>FERMENTACIÓN Y DEGRADACIÓN RUMINAL DE LOS ALIMENTOS</i>	7
3.2.1 <i>Fermentación de los carbohidratos</i>	7
3.2.2 <i>Fermentación de la proteína</i>	8
3.2.3 <i>Fermentación de la grasa</i>	9
3.3 <i>PRODUCTOS DE LA FERMENTACIÓN RUMINAL</i>	10
3.3.1 <i>Ácidos Grasos Volátiles</i>	10
3.3.2 <i>Metano y CO₂</i>	12
3.4 <i>TÉCNICA DE PRODUCCIÓN DE GAS COMO HERRAMIENTA PARA CUANTIFICAR LA FERMENTACIÓN Y DEGRADACIÓN RUMINAL</i>	15
3.5 <i>EMISIONES DE METANO DERIVADAS DE LA PRODUCCIÓN ANIMAL</i>	16
3.6 <i>ALTERNATIVAS DE MANEJO NUTRICIONAL PARA MITIGAR LA PRODUCCIÓN DE METANO</i>	17
4. MATERIAL Y MÉTODOS	19
4.1 <i>FASE DE CARACTERIZACIÓN</i>	19
4.1.1 <i>Caracterización de rebaños y recolección de las muestras de alimento</i>	19
4.1.2 <i>Analítica química de muestras de alimento</i>	20
4.1.3 <i>Clasificación de forrajes</i>	21
4.1.4 <i>Incubaciones in vitro</i>	22

4.1.5 Cálculos y análisis estadístico	25
4.1.5.1 Parámetros de la cinética de producción de gas	25
4.1.5.2 Determinación de la digestibilidad in vitro de la materia orgánica	26
4.1.5.3 Estimación de parámetros de síntesis microbiana	26
4.1.5.4 Estimación de la producción de metano	27
4.1.5.5 Análisis estadístico	28
4.2 FASE DE MITIGACIÓN	29
4.2.1 Tratamientos experimentales	29
4.2.2 Incubaciones in vitro, cálculos y análisis estadístico	32
5. RESULTADOS	35
5.1 FASE DE CARACTERIZACIÓN	35
5.1.1 Raciones de parto	35
5.1.1.1 Analítica química de las muestras de alimento	37
5.1.1.2 Clasificación de forrajes	37
5.1.1.3 Cinética de producción de gas	38
5.1.1.4 Digestibilidad in vitro de la materia orgánica y ácidos grasos volátiles	40
5.1.1.5 Parámetros de síntesis microbiana y producción de metano	40
5.1.2 Raciones de inicio de lactación	43
5.1.2.1 Analítica química de las muestras de alimento	44
5.1.2.2 Clasificación de Forrajes	45
5.1.2.3 Cinética de producción de gas	45
5.1.2.4 Digestibilidad in vitro de la materia orgánica y ácidos grasos volátiles	46
5.1.2.5 Parámetros de síntesis microbiana y producción de metano	47
5.1.3 Comparación entre estados fisiológicos (parto vs. inicio de lactación)	51
5.1.3.1 Cinética de producción de gas	51
5.1.3.2 Digestibilidad in vitro de la materia orgánica y ácidos grasos volátiles	52
5.1.3.3 Parámetros de síntesis microbiana	53
5.2 FASE MITIGACIÓN	54
5.2.1 Cinética de producción de gas	54
5.2.2. Digestibilidad in vitro de la materia orgánica	58

5.2.3 Ácidos grasos volátiles	60
5.2.4. <i>Parámetros de síntesis microbiana y producción de metano</i>	63
6. DISCUSIÓN	67
6.1 <i>Caracterización de los sistemas productivos</i>	67
6.2 <i>Incubaciones in vitro</i>	70
6.3. <i>Estrategia de mitigación</i>	75
7. CONCLUSIONES	79
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición química del medio de cultivo	23
Tabla 2. Analítica química y clasificación de los forrajes experimentales.....	30
Tabla 3. Ingredientes y analítica química de los piensos experimentales	31
Tabla 4. Caracterización de raciones suministradas durante la fase de parto en rebaños comerciales de ovino lechero en la CAPV	36
Tabla 5. Composición química calculada (g/kg) de raciones de parto suministradas en rebaños comerciales de ovino lechero de la CAPV	37
Tabla 6. Parámetros del ajuste de producción de gas y producción de gas total por día de raciones incubadas de parto suministradas en rebaños comerciales de ovino lechero de la CAPV	39
Tabla 7. Digestibilidad <i>in vitro</i> de la materia orgánica (g/100g) y producción de ácidos grasos volátiles de raciones de parto suministradas en rebaños comerciales de ovino lechero de la CAPV	41
Tabla 8. FP ₂₄ (mg MO/ml), AGV:MOF (mmol/g MO), SBM ₂₄ (mg), ESM ₂₄ (g/100g) y metano/día estimados <i>in vitro</i> a partir de la incubación de raciones de parto suministradas en rebaños comerciales de ovino lechero de la CAPV	42
Tabla 9. Caracterización de raciones suministradas durante la fase de inicio de lactación en rebaños comerciales de ovino lechero en la CAPV	44
Tabla 10. Composición química calculada (g/kg) de raciones de inicio de lactación suministradas en rebaños comerciales de ovino lechero de la CAPV	45
Tabla 11. Parámetros del ajuste de producción de gas y producción de gas total por día de raciones de incubadas de inicio de lactación suministradas en rebaños comerciales de ovino lechero de la CAPV	48

Tabla 12. Digestibilidad <i>in vitro</i> de la materia orgánica (g/100g) y producción de ácidos grasos volátiles de raciones de inicio de lactación suministradas en rebaños comerciales de ovino lechero de la CAPV	49
Tabla 13. FP ₂₄ (mg MO/ml), AGV:MOF (mmol/g MO), SBM ₂₄ (mg) y ESM ₂₄ (g/g) y producción de metano/día estimados <i>in vitro</i> a partir de la incubación de raciones de inicio de lactación suministradas en rebaños comerciales de ovino lechero de la CAPV	50
Tabla 14. Análisis del efecto de la etapa productiva sobre los parámetros del ajuste de producción de gas, producción de gas total por día y producción de metano de raciones incubadas de parto e inicio de lactación suministradas en rebaños comerciales de ovino lechero de la CAPV	52
Tabla 15. Análisis del efecto de la etapa productiva sobre la producción de ácidos grasos volátiles en el fluido ruminal durante la incubación <i>in vitro</i> de raciones de parto y inicio de lactación suministradas en rebaños comerciales de ovino lechero de la CAPV	53
Tabla 16. Análisis del efecto de la etapa productiva sobre FP ₂₄ (mg MO/ml), AGV:MOF (mmol/g MO), SMB ₂₄ (mg) y ESM ₂₄ (g/g) estimados <i>in vitro</i> a partir de la incubación de raciones de parto y inicio de lactación suministradas en rebaños comerciales de ovino lechero de la CAPV	54
Tabla 17. Efecto del tipo de forraje, tipo de grasa y nivel de inclusión de grasa en la ración total sobre los parámetros del ajuste de producción de gas de las raciones experimentales incubadas.	56
Tabla 18. Efecto del tipo de forraje, tipo de grasa y nivel de inclusión de grasa en la ración total sobre la producción de gas/día por gramo de materia orgánica incubada de raciones experimentales.	57
Tabla 19. Efecto del tipo de forraje, tipo de grasa y nivel de inclusión de grasa en la ración sobre la producción <i>in vitro</i> de AGV en el fluido ruminal	61
Tabla 20. Efecto del tipo de forraje, tipo de grasa y nivel de inclusión de grasa en la ración en FP ₂₄ (mg MO/ml), SBM ₂₄ (mg), ESM ₂₄ (g/g) y AGV:SVF (mmol/g MOF) de raciones experimentales.	64

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Formación de ácidos grasos volátiles y metano en el rumen.....	11
Figura 2. Efecto del tipo de heno y el nivel de grasa en las raciones experimentales sobre la producción de gas/día por gramo de materia orgánica fermentable.....	58
Figura 3. Efecto del tipo y nivel de grasa en las raciones experimentales sobre digestibilidad verdadera <i>in vitro</i> de la materia orgánica (g/g).....	59
Figura 4. Efecto del tipo de grasa y la calidad del heno en las raciones experimentales sobre la digestibilidad verdadera <i>in vitro</i> de la materia orgánica (g/g).....	59
Figura 5. Efecto del nivel de grasa y la calidad del heno en las raciones experimentales sobre la producción de ácido acético (g/g del total de AGV).....	62
Figura 6. Efecto del nivel de grasa y la calidad del heno en las raciones experimentales sobre el ratio ácido acético:propiónico.....	62
Figura 7. Efecto del nivel de grasa y la calidad del heno en las raciones experimentales sobre la producción de metano por gramo de materia orgánica incubada.....	65
Figura 8. Efecto del nivel de grasa y la calidad del heno en las raciones experimentales sobre la producción de metano por gramo de materia orgánica fermentada.....	65

ABREVIATURAS

A: Producción potencial de gas (ml/g MOI)

AGV: Ácido Graso Volátil : Materia Orgánica Fermentable

B: Tiempo de incubación en el que se alcanza una producción de gas equivalente a la mitad del valor potencial (h)

c: Constante adimensional que determina la forma de la curva

CAPV: Comunidad Autónoma del País Vasco

CC: Crisol más Cenizas

CMS: Crisol más Materia Seca

DE: Desviación Estándar

DIVMO: Digestibilidad *in vitro* de la Materia Orgánica

DMS: Digestibilidad de la Materia Seca

EEM: Error Estándar de la Media

ESM₂₄: Eficiencia de la Síntesis Microbiana a 24 horas

FAD: Fibra Ácido Detergente

Fig: Figura

FND: Fibra Neutro Detergente

FP₂₄: Factor de Partición a 24 horas

G: Producción de gas (ml/g MOI) a tiempo *t*,

GB: Grasa Bruta

IMS: Ingestión de Materia Seca

MO: Materia Orgánica

MOB: Materia Orgánica del Blanco

MOF: Materia Orgánica Fermentable

MOI: Materia Orgánica Incubada

MOR: Materia Orgánica del Residuo

MS: Materia Seca

PB: Proteína Bruta

PV: Peso Vivo

R_M: Tasa de producción de gas máxima

SBM₂₄: Síntesis de Biomasa Microbiana a 24 horas

T: Efecto debido al estado fisiológico o efecto debido a la ración dentro de cada estado, según el caso.

t_{RM}: Tiempo de incubación necesario para que se alcance la tasa de producción de gas máxima

VRF: Valor Relativo Forrajero

Y: Variable dependiente

ε: Error residual

μ: Media poblacional

1. INTRODUCCIÓN

La producción de ovino lechero es una de las actividades ganaderas más representativas de la Comunidad Autónoma del País Vasco, convirtiéndose en el eslabón productivo de rumiantes con la más alta representación dentro de la producción de rumiantes domésticos. Dicha producción se realiza fundamentalmente a partir de rebaños constituidos por ovejas de la raza Latxa que son gestionados bajo diferentes sistemas de manejo productivo en el cual la gestión nutricional está condicionada en gran medida por la disponibilidad de pasto a lo largo del año y por las necesidades nutricionales de los animales en función de su estado fisiológico. Además, durante los últimos años se ha observado un cierto interés por el papel que pueden desempeñar las razas foráneas de alta producción. De hecho, en la actualidad existen varios rebaños de raza Assaf manejados mediante sistemas de estabulación permanente que si bien no representan un porcentaje significativo de la cabaña ganadera, suponen un cambio sustancial en las prácticas de manejo, principalmente de alimentación y estrategias de producción.

La caracterización y el estudio de la calidad nutricional de las raciones suministradas a lo largo de las distintas fases del ciclo productivo, en particular su valor nutritivo, digestibilidad, cinéticas de degradación y rutas metabólicas de fermentación, son de gran importancia para determinar cuan acertado resulta determinado manejo nutricional. Del mismo modo, el conocer dichos aspectos resulta clave para planear estrategias de mejora orientadas a optimizar la eficiencia productiva y reducir las emisiones asociadas a un bajo aprovechamiento de las raciones.

De cara al debate científico que se está desarrollando sobre el progreso e incremento de la producción animal y sus implicaciones en el cambio climático por cuenta de las emisiones de gases de efecto invernadero, en las cuales la emisión de metano proveniente de la fermentación entérica de rumiantes es uno de los ítems que despierta gran interés, la importancia de cuantificar dichas emisiones también radica en la cada vez más apremiante necesidad de proponer estrategias de mitigación.

2. OBJETIVO

El trabajo de investigación se planteó con el objetivo concreto de evaluar los parámetros de fermentación ruminal, la digestibilidad y emisiones de metano *in vitro* de las dietas empleadas en explotaciones de ovino lechero representativas de sistemas de producción con diferente nivel de intensificación en la Comunidad Autónoma del País Vasco, así como proponer estrategias de mitigación de emisiones de metano para estos sistemas ganaderos.

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

3.1 OVINO DE LECHE EN LA COMUNIDAD AUTÓNOMA DEL PAÍS VASCO

La producción de leche ovina en España ha aumentado en el tiempo, teniendo registros de un 15,5% de incremento entre el año 2009 a 2010 (MARM, 2011a), lo cual ha sido favorecido por la considerable población ovina y las características productivas de las razas explotadas, permitiendo que para el año 2011 el país se posicione como un importante productor lechero a nivel mundial en el noveno lugar con un total de 519.600 T de leche (Martínez et al., 2011; FAOSTAT, 2013).

La producción de leche ovina en la CAPV se realiza fundamentalmente a partir de rebaños constituidos por animales de raza Latxa gestionados bajo diferentes sistemas de manejo productivo en los que suceden etapas de estabulación permanente, pastoreo en zonas de valle, y en ocasiones también en pastos de montaña. Durante los últimos años se ha asistido a un proceso generalizado de intensificación de las prácticas de alimentación, caracterizado por un uso creciente de piensos concentrados e incluso la introducción de mezclas. Por diferentes motivos, incluso se ha optado por la utilización de ovejas de raza Assaf, si bien su presencia en la CAPV se puede considerar de momento testimonial. Para noviembre del año 2011, la población total ovina registrada fue de 308.129 cabezas, lo cual representa el 1.81% de la población total nacional ; del mismo modo, el aporte en producción de leche al total nacional para el año en mención fue de 8.551 Toneladas, un 1,51% (MARM, 2011b).

La base del sistema productivo de leche ovina se encuentra constituido por ovejas Latxa, raza lechera local adaptada a las características medioambientales propias del territorio conformada por dos poblaciones separadas genéticamente que se diferencian por el color de la piel en Latxa cara negra y Latxa cara rubia (Ruiz et al., 1997; Ugarte et al., 1999). Su sistema de producción en granja por lo general se describe como un sistema mixto intensivo-extensivo. Durante el invierno y primavera, el cual se corresponde con el periodo de partos, amamantamiento de corderos y ordeño, los rebaños son alimentados durante

algunas horas en pastoreo, concentrados en establo y forrajes preservados. Por lo general, una vez los animales son secados, los rebaños son movidos a pastos comunales en áreas de montaña donde suelen estar alrededor de 5 meses (Ruiz et al., 1997; Gabiña y Ugarte, 2001) luego de lo cual retornan a la granja y comienzan a recibir forraje y concentrado generalmente en pesebre cerca de un mes antes del parto (Gabiña et al., 2000). Varias razones resultan relevantes al momento de considerar la existencia y permanencia de este tipo de sistema productivo en la región, tales como motivos sociales, culturales, económicos, ambientales y de preservación de áreas comunales (Ugarte et al., 1999), aunque la mayor importancia desde el punto de vista económico lo sustenta la transformación de la leche producida en el queso con denominación de origen protegido, conocido como Idiazábal (Gabiña y Ugarte, 2001; Ruiz et al., 2011).

De igual forma, se han identificado rebaños que utilizan razas foráneas puras o en cruzamiento como la Assaf, Awasi, Lacaune y East Friesian, suceso que ha generado a que se calcule que el 45% de los rebaños de ovino lechero en España o son rebaños de razas foráneas o tienen algún tipo de cruzamiento con el tipo de razas anteriormente mencionadas. Según Legaz et al. (2008), la raza Assaf representa la principal raza ovina lechera de España. De manera general, el manejo de los sistemas productivos de razas foráneas como la Assaf no es compatible con los sistemas tradicionales extensivos, ya que no es frecuente el manejo en pastoreo de montaña, el uso de campos de rastrojos ni de subproductos de la agricultura, requiriendo de manera principal condiciones productivas de manejo estabulado permanente, lo cual incrementa los costos de producción (Ugarte et al., 2001).

Por tanto, resulta importante profundizar en el conocimiento de los sistemas de alimentación de los principales sistemas ovinos, así como en sus implicaciones sobre los aspectos productivos y ambientales. Las metodologías de incubación *in vitro* ofrecen la posibilidad de analizar con detalle y de manera relativamente económico el comportamiento fermentativo, la degradación y emisiones de gases de efecto invernadero de un gran número de muestras. En la medida que estas sean representativas de las utilizadas en los sistemas de producción, los resultados obtenidos podrían ser utilizados

como referencia en los programas de asesoramiento a los ganaderos y en la toma de decisiones.

3.2 FERMENTACIÓN Y DEGRADACIÓN RUMINAL DE LOS ALIMENTOS

La fermentación y degradación ruminal es principalmente el resultado de la actividad de bacterias, protozoos y hongos que allí cohabitan y actúan sobre las diferentes fracciones que componen el alimento. De manera particular, esta microflora ruminal hace posible que la fracción fibrosa ingerida que no puede ser enzimáticamente digerida por el animal, sea degradada y fermentada hacia ácidos grasos volátiles, gases de fermentación y calor o incorporada a la materia microbiana digestible (Williams, 2000; Bannink y Tamminga, 2005b). La dinámica de la degradación y fermentación de la materia orgánica en el rumen y la digestión de los mismos en el intestino son los mayores determinantes de la utilización de las raciones en los rumiantes. Por lo tanto es relevante que esa dinámica de los procesos sea conocida y entendida para que luego pueda ser controlada o modulada con el fin de mejorar su aprovechamiento en el tracto gastrointestinal y optimizar los parámetros productivos de interés (Van der Poel et al., 2005).

3.2.1 Fermentación de los carbohidratos

Los carbohidratos que sufren procesos fermentativos en el rumen generalmente abarcan tres tipos de compuestos: la fibra, el almidón y los carbohidratos solubles (Dijkstra et al., 2005a). La degradación de la fracción de carbohidratos estructurales o fibra neutro detergente (FND) ha sido caracterizada mediante técnicas tanto *in situ* como *in vitro*, las cuales o bien ofrecen resultados en términos de tasa de desaparición del sustrato a un determinado tiempo o cinéticas de degradación mediante mediciones de producción de gas. A partir de reportes sobre tasas de degradabilidad de dicha fracción recopilados por Bannink y Tamminga (2005a), registran valores que varían desde un 13% hasta un 82% y

que según el autor, dependen más de las características propias de degradación de la FND que de su nivel de ingestión.

Por su parte, el almidón es un constituyente importante en la dieta de rumiantes al ser el compuesto principal de los piensos. Una fracción del almidón por lo general es parcialmente fermentada en el rumen y otra puede escapar para ser digerida enzimáticamente en el intestino y ser absorbida como glucosa; del mismo modo debe considerarse que parte del almidón puede ser incorporado dentro de los microorganismos amilolíticos como reserva de polisacáridos, constituyéndose en una vía a considerar de llegada del almidón al duodeno (Bannink y Tamminga, 2005a). Mediante la aplicación de técnicas *in situ* y/o *in vitro* se han establecido características de las fuentes de almidón relacionadas con su susceptibilidad a la degradación microbial, identificando que la mayor parte de los tipos de almidón son altamente degradables en el rumen, teniendo valores de hasta 95%; sin embargo tal y como para el caso de los carbohidratos estructurales, estos valores son sólo orientativos y las condiciones reales del rumen influenciarán en cierta medida la degradación *in vivo* (Bannink y Tamminga, 2005a).

Con respecto a la degradación y fermentación de los carbohidratos solubles, debe mencionarse que ésta es bastante rápida y mucho más completa que para varias fuentes de almidón, asumiéndose que son fermentados en el rumen casi instantáneamente después de la ingestión, por lo que también se considera que la degradación y fermentación de grandes cantidades de estos carbohidratos inducen fluctuaciones en el pH que pueden tener consecuencias negativas sobre la actividad fibrolítica y la población protozoal (Bannink y Tamminga, 2005a).

3.2.2 Fermentación de la proteína

La proteína constituye la principal fuente de nitrógeno en la mayor parte de las dietas para rumiantes y su degradación y fermentación debe considerarse como un factor importante que influye a la fermentación ruminal y al suministro de aminoácidos al animal

(Grossblatt, 2001b). Como es bien sabido, la proteína es hidrolizada por las proteasas secretadas por la microflora ruminal dando lugar entonces a péptidos y aminoácidos. Sin embargo grado de degradación y fermentación dependerá de: la actividad proteolítica de la microflora ruminal como de la estructura, solubilidad, susceptibilidad y accesibilidad a los enlaces peptídicos, la tasa de paso ruminal de la digesta, la interacción con otros nutrientes y técnicas de procesamiento de alimentos, entre otros factores (Cone y van Gelder, 1999; Atasoglu y Wallace, 2003; Bach et al., 2004). El destino de los péptidos y aminoácidos absorbidos por las células microbianas dependerá de la disponibilidad de energía, ya que si es suficiente estos aminoácidos serán transaminados o usados directamente para la síntesis de proteína microbiana. Tal y como afirma Grossblatt (2001b) y Bannink y Tamminga (2005a), el conocimiento de la cinética y de la tasa fraccional de degradación ruminal de las proteínas del alimento es fundamental para formular dietas que suministren cantidades adecuadas de proteína degradable y aprovechable para los microorganismos ruminales y de proteína no degradable en el rumen pero directamente absorbible por el animal hospedador.

3.2.3 Fermentación de la grasa

Los lípidos en las dietas de rumiantes se encuentran tanto en los forrajes consumidos como en semillas de oleaginosas, mezclas de grasas animales y vegetales, grasas secas granuladas o grasas protegidas que son suministradas en la ración. Los lípidos ingeridos provenientes en menor medida de las plantas y en su mayoría del aporte de las semillas del pienso, son altamente modificados por los procesos de fermentación y degradación ruminal que tienden a favorecer la hidrogenación, antes de ser finalmente absorbidos por el animal. Así, los procesos de lipólisis ruminal ocasionan la liberación de ácidos grasos que más tarde serán biohidrogenados y que pueden o bien salir del rumen a través del epitelio ruminal o ser catabolizados a ácidos grasos volátiles o dióxido de carbono. De manera adicional, los microorganismos ruminales sintetizan ácidos grasos y aportan entre un 10 a 15% de los ácidos grasos absorbidos (Van Soest, 1983d; Jenkins, 1993; Grossblatt, 2001a). Debe considerarse que el tipo y fuente de grasa de la dieta pueden alterar los patrones de

fermentación ruminal al ocasionar una reducción de la digestibilidad de los carbohidratos estructurales hasta en un 50% al adicionar hasta un 10% de grasa, mientras que su efecto en los carbohidratos no estructurales y en la fracción proteica es menor (Jenkins, 1993). Van Soest (1983d) reporta que los ácidos grasos insaturados inhiben en una mayor medida la fermentación que los ácidos grasos saturados; del mismo modo Jenkins (1993) considera que el modo de administración de una grasa insaturada tiene una influencia variable en los patrones de fermentación.

3.3. PRODUCTOS DE LA FERMENTACIÓN RUMINAL

La fermentación microbiana ocurrida en el rumen genera productos que pueden ser aprovechables para el animal tales como los ácidos grasos volátiles y proteína microbiana, y otro tipo de productos que se consideran desechos, tales como el dióxido de carbono y el metano (Williams, 2000; Getachew et al., 2005b; Mitsumori y Weibin, 2008).

3.3.1 Ácidos Grasos Volátiles

A partir de los procesos hidrolíticos ocurridos en el rumen sobre diferentes componentes del alimento, se genera de manera principal la liberación de monómeros que son fermentados intracelularmente por el metabolismo anaeróbico en ácidos grasos volátiles, constituidos básicamente por ácido acético, propiónico y butírico, así como por pequeñas cantidades de ácido valérico, caprónico, isobutírico, isovalérico, 2-metil butírico y trazas de otros varios ácidos (Figura 1) (Van Soest, 1983b; Bannink y Tamminga, 2005a; Dijkstra et al., 2005b). Debe considerarse que junto a los carbohidratos, la fermentación de los lípidos y proteína de la ración también contribuyen en la producción de ácidos grasos volátiles, siendo menor para los lípidos y considerable para las proteínas cuando las dietas tienen alto contenido de proteína degradable en el rumen o cuando ocurre un aporte considerable de valina, leucina e isoleucina, que específicamente favorecerán la formación de ácido

isobutírico, isovalérico y 2-metil butírico (France y Dijkstra, 2005). Para la población microbiana la mayoría de estos ácidos grasos volátiles constituyen productos de desecho pero para el rumiante representa la principal fuente de energía absorbida, llegando a representar entre un 50% a 70% de la energía digestible ingerida para el caso de ovejas en mantenimiento (Van Soest, 1983b; France y Dijkstra, 2005).

El aporte energético y el destino metabólico de cada tipo de ácidos grasos producidos varía, siendo el acetato el principal sustrato para la lipogénesis, mientras que el propionato es usado para gluconeogénesis. Así pues, es de tenerse en cuenta que el balance entre la tasa de ácidos grasos volátiles glucogénicos / no glucogénicos afecta a la eficiencia de su uso para fines productivos así como su contribución en la composición de los productos finales (Van Soest, 1983a; Bannink y Tamminga, 2005a; France y Dijkstra, 2005).

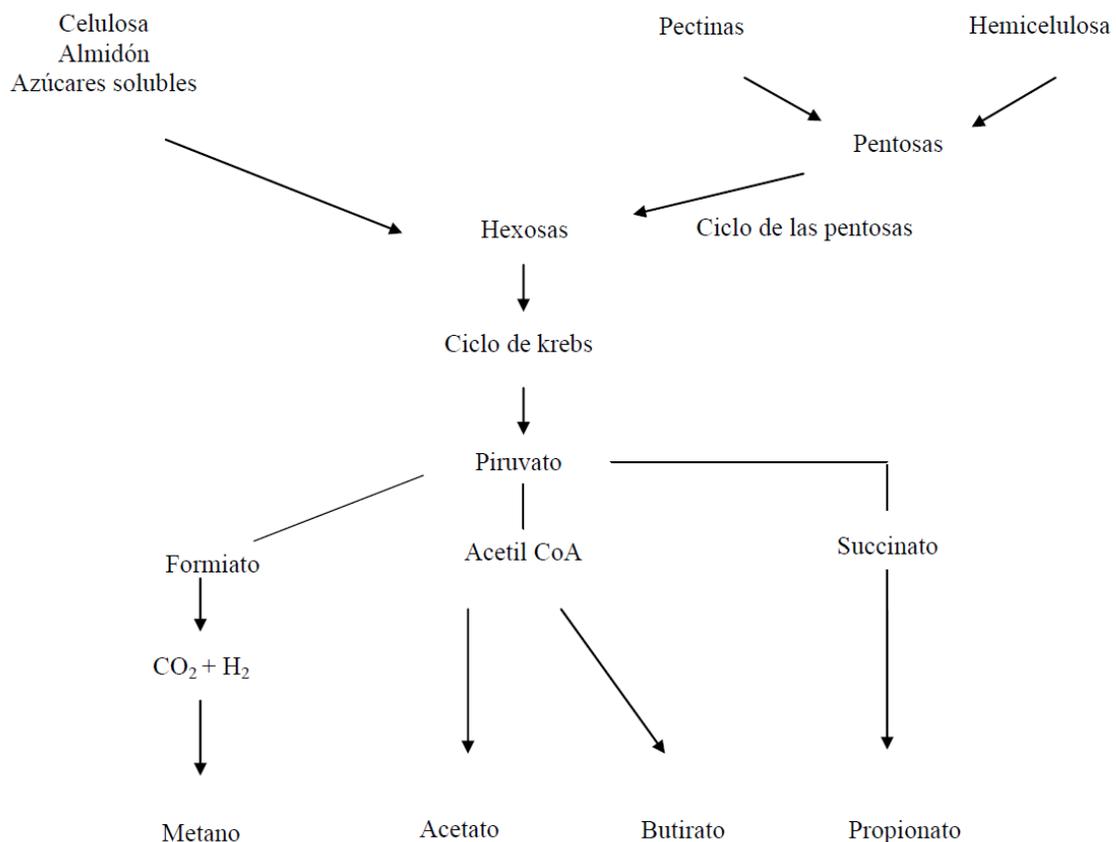


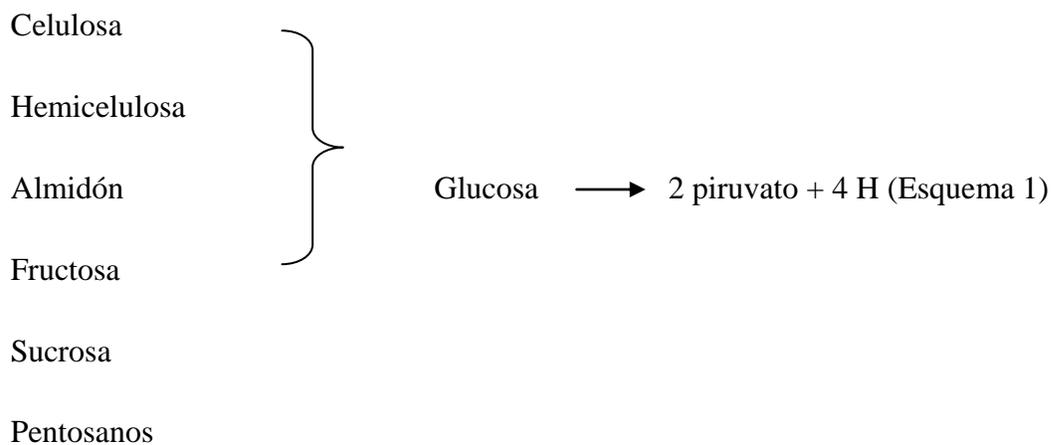
Fig 1. Formación de ácidos grasos volátiles y metano en el rumen (Tomado y modificado de Dijkstra et al. (2005a)

3.3.2. Metano y CO₂

Los procesos fermentativos que prevalecen en el rumen normalmente generan un ambiente reductor. Por un lado, en dichas condiciones anaeróbicas las reacciones de oxidación – reducción necesarias para obtener energía en forma de ATP a partir del piruvato se encuentran mediadas por las coenzimas NAD y FAD que actúan como transportadores de electrones y que deben tener un estado constante en sus formas oxidadas y reducidas. Sin embargo, a pesar de que entre ellas existe un flujo constante de hidrogeniones, puede darse la condición de que el sistema regulador de dicho proceso se inhiba y exista una alta presión

de hidrogeno, lo cual afecta la fermentación en general y favorece la formación de metano (France y Dijkstra, 2005; Bell y Eckard, 2012; Bodas et al., 2012). De igual modo, si se considera que la fermentación microbiana genera diferentes ácidos grasos volátiles que no son equivalentes en términos de uso o liberación de hidrógeno para su formación, se concluye que existe una estrecha relación entre el patrón de fermentación, la tasa de producción de ácidos grasos volátiles, las emisiones de metano y por ende se considera un proceso altamente dependiente de la ración ingerida (Mirzaei-Aghsaghali y Maheri-Sis, 2011; Wright y Klieve, 2011). De cualquier manera el exceso del poder reductor generado durante la conversión de glucosa a ácido acético o butírico debe ser dispuesto en una vía rápida y eficiente, lo cual es facilitado por la presencia de arqueas metanogénicas que lo utilizan como sustrato para reducir el carbono y formar metano (Esquema 1) (France y Dijkstra, 2005; Mitsumori y Weibin, 2008; Lascano y Cárdenas, 2010; Mirzaei-Aghsaghali y Maheri-Sis, 2011). Cabe resaltar la relevancia de los protozoos en los procesos de formación de metano, pues ellos mantienen una relación simbiótica con las arqueas metanogénicas con quienes están asociados intra y extracelularmente y realizan transferencia de este hidrógeno (Hook et al., 2010)

Esquemáticamente, el flujo de hidrogeno procedente de los procesos fermentativos hasta la formación de piruvato es el siguiente (Bell y Eckard, 2012):





Debe considerarse también que la formación de ácido propiónico lleva implícita el uso de moléculas de hidrógeno. Así pues, si los niveles de sustrato que favorezcan un tipo de fermentación propiónica son altos, bien sea por incrementar la ingestión de alimento o por sus características intrínsecas, se puede producir un cambio en el patrón de fermentación de ácido acético a propiónico y de esta manera contribuir en un descenso del poder reductor (Esquema 2) (France y Dijkstra, 2005)



Aunque en menor medida, la fermentación en el intestino grueso también contribuye a la producción de metano, aunque no es constante y depende del nivel de ingestión y de la cantidad de materia orgánica que escape de la fermentación ruminal y llegue al tracto posterior (France y Dijkstra, 2005).

Las estimaciones de la cantidad de metano producido pueden realizarse mediante la aplicación de procedimientos *in vivo* como la técnica SF₆ (técnica de marcado con hexafloruro de azufre) o *in vitro* por medio de la técnica de producción de gas o en el sistema de fermentación continua que simula las condiciones del rumen RUSITEC, los cuales han sido validados encontrando siempre una mayor correlación con la medición mediante la técnica de producción de gas (0.74 a 0.98) que con el RUSITEC (0.16 a 0.20) (Bhatta et al., 2007).

3.4 TÉCNICA DE PRODUCCIÓN DE GAS COMO HERRAMIENTA PARA CUANTIFICAR LA FERMENTACIÓN Y DEGRADACIÓN RUMINAL

La fermentación, degradación y digestibilidad de los alimentos han sido reconocidos como las principales fuentes de variación de la ración y de sus componentes alimenticios, por lo cual se hace necesario conocer y cuantificar dichos procesos (Dijkstra et al., 2005a). Si bien sería interesante monitorizar en todo momento las materias primas, piensos o dietas completas de rumiantes en todas las situaciones posibles *in vivo* para conocer tanto cualitativa como cuantitativamente los nutrientes ingeridos, en la práctica esto no es factible ni viable económicamente (Dijkstra et al., 2005b; Navarro-Villa et al., 2011). La búsqueda de métodos que fuesen económicos, simples, de fácil adopción, eficientes, que tuvieran la posibilidad de evaluación de un amplio número de muestras en el tiempo con el uso mínimo de animales ha llevado al desarrollo de numerosas técnicas *in vitro* e *in situ*, que utilizando la aplicación de modelos matemáticos vinculan los datos obtenidos con los procesos que ocurren *in vivo*, generando una aproximación e indicando un nivel de confiabilidad de la respuesta obtenida (Williams, 2000; Getachew et al., 2005a; López, 2005).

De manera general las técnicas *in vitro* resultan similares entre sí ya que utilizan como sustrato la muestra molida de interés, un medio de incubación tamponante y un inóculo que por lo general es líquido ruminal, lo cual en conjunto se pone a incubar en condiciones de anaerobiosis a temperatura controlada, realizando mediciones de los indicadores de interés con cierta periodicidad (Williams, 2000; López, 2005). Este tipo de métodos pretenden simular las condiciones de digestión *in vivo* y permiten la manipulación de diversidad de factores de variación de una manera controlada, lo cual facilita su uso en el estudio de la incidencia de componentes individuales sobre los parámetros de fermentación, pudiendo evaluar la interacción entre componentes de la ración (Wood y Manyuchi, 1997; Tang et al., 2008), las variaciones particulares en el inóculo (Calabrò et al., 2005), la evaluación de compuestos secundarios del alimento (Makkar, 2005), además de permitir realizar la predicción del valor nutritivo de los alimentos (Williams, 2000) así como la cuantificación

de la producción de metano (Blümmel et al., 2005; Getachew et al., 2005a). La técnica asume que la tasa de producción de gas es directamente proporcional a la tasa de fermentación del sustrato incubado (France et al., 2000), aunque debe tenerse claro que la tasa de fermentación no puede ser considerada por sí sola como un predictor de la tasa de degradación en vista de la influencia de la síntesis de biomasa microbiana (Chenost et al., 2001).

El gas producido es medido como un indicador indirecto de la cinética de fermentación, pudiendo estimar los parámetros que determinan dicha cinética mediante la aplicación de modelos matemáticos no lineales a partir de los valores registrados luego de mediciones periódicas (López, 2005; Rymer et al., 2005). Según Getachew et al. (2005a) y Dijkstra et al. (2005b) estas técnicas han ganado relevancia como herramienta de investigación en comparación con otras *in vitro* debido a su capacidad de proporcionar datos que describen la cinética, el grado y la tasa de degradación de una muestra, así como por permitir identificar y cuantificar la aparición de productos de fermentación. Sin embargo, a pesar de dicho potencial debe tenerse en cuenta que sólo genera una aproximación de lo que sucede en condiciones *in vivo*, pues carece de la complejidad que normalmente acontece en el rumen del animal y por lo tanto no puede ser un indicativo estrictamente preciso de las interacciones entre los componentes presentes en el alimento y la población microbiana. De igual modo, debe considerarse que si se pretende determinar la degradación de cada uno de los componentes de la materia orgánica se hace necesario la implementación de técnicas adicionales (Dijkstra et al., 2005b).

3.5 EMISIONES DE METANO DERIVADAS DE LA PRODUCCIÓN ANIMAL

Junto con los procesos industriales, las prácticas agrícolas y pecuarias contribuyen de manera notable a la emisión de gases de efecto invernadero, identificándose al metano como uno de los gases con mayor efecto sobre el calentamiento global, debido a su alto potencial de calentamiento y un tiempo de vida atmosférico de 12 años (Mirzaei-Aghsaghali y Maheri-Sis, 2011; Navarro-Villa et al., 2011; Wright y Klieve, 2011).

Abberton et al. (2008) afirman que la agricultura, la ganadería y la silvicultura contribuyen en un 30% con los gases de efecto invernadero mundial y con un 10% en el caso de Europa, por lo cual el estudio de estos dos ámbitos son identificados de interés para mitigar emisiones. De manera global, el sector primario y en particular la fermentación entérica en rumiantes produce de un 21 a un 25% del total de las emisiones de metano (Abberton et al., 2008) y según cifras reportadas por Hook et al. (2010) los rumiantes domésticos tales como ganado bovino, ovino y caprino producen cerca de 86 millones de toneladas métricas de metano por año, de las cuales aproximadamente 18,9 TM provienen de ganado de leche, 55,9 TM de ganado de carne y 9,5 de ovejas y cabras. Así pues, considerar la implementación de nuevas tecnologías que tengan como objetivo específico reducir las emisiones tendrá un impacto significativo. Bodas et al. (2012) consideran que desde el punto de vista medioambiental global, el interés final debe ser el control de las emisiones de metano de todo el sistema productivo, lo cual abarca varios aspectos en los cuales la intervención humana deben considerarse también. Por su parte Aguilar-Pérez et al. (2011) considera que dado que las estrategias de mitigación se encuentran limitadas a factores específicos como la dieta, condiciones de manejo, estado fisiológico, destino productivo del animal y regulaciones gubernamentales, resulta difícil desarrollar y aplicar una medida única que abarque la solución al problema de mitigación de metano entérico.

3.6 ALTERNATIVAS DE MANEJO NUTRICIONAL PARA MITIGAR LA PRODUCCIÓN DE METANO

Teniendo en cuenta la consideración de Dijkstra et al. (2005a) referente a que los tres factores ligados a la nutrición que afectan en mayor medida a la producción de metano son la tasa de degradación de la materia orgánica, la eficiencia de crecimiento microbiano y el tipo de ácidos grasos producidos, las estrategias de manejo aplicadas que modulen estos componente se convierten en puntos determinantes que marcarán tanto la eficiencia de uso de los recursos alimenticios como las emisiones asociadas (Getachew et al., 2005b). Para que sean efectivas, las estrategias nutricionales de mitigación deben actuar básicamente por

dos vías: un efecto de modulación directa sobre la población metanogénica, la cual según Chenost et al. (2001) constituye el grupo de microorganismos ruminales más selectivo y es afectado por varios factores relacionados con la dieta, o un efecto indirecto causado por la disponibilidad de sustratos para la metanogénesis, lo cual usualmente sucede por modificaciones sobre otros microbios del rumen (Hook et al., 2010). Según Lascano y Cárdenas (2010) la manipulación de la composición de nutrientes de la dieta de los rumiantes puede reducir directamente la emisión de metano por el hecho de que no todos sus componentes se fermentan de la misma manera en el rumen, lo cual genera diferentes productos finales y cantidades de metano por unidad de componente nutricional fermentado (Bodas et al., 2012). Considerando que el hidrógeno que será reducido para la formación de metano se genera principalmente a partir de la fermentación de los carbohidratos estructurales, el control sobre la degradación de estos debe considerarse con mayor atención (Mitsumori y Weibin, 2008). Dentro de las fuentes de carbohidratos estructurales, se presentan diferencias en los patrones de fermentación y en las emisiones, reportándose que la hidrólisis de leguminosas tales como la alfalfa y el trébol rojo produce menos metano por gramo de materia seca ingerida cuando se compara con otro tipo forrajes (Ramírez-Restrepo y Barry, 2005). De otra parte, con frecuencia suele asumirse que un sistema de alimentación con una mayor parte de pienso producirá menos metano con respecto a una dieta con alto contenido de forrajes (Johnson y Johnson, 1995). Sin embargo el tipo de carbohidrato aportado por los piensos también influye, pues Johnson y Johnson (1995) reportan que los azúcares solubles producen más metano que el almidón, registrándose que su reemplazo por almidón en el pienso reduce cerca de un 15% la producción de metano (Bodas et al., 2012).

El considerar componentes específicos de la ración y sus posibles modulaciones son relevantes al momento de evaluar estrategias para reducir las emisiones. Sin embargo el manejo integral del sistema alimenticio también deberá tenerse en cuenta, pues como afirman Mirzaei-Aghsaghali y Maheri-Sis (2011), el favorecer la calidad del forraje, en conjunto con un adecuado manejo de la carga ganadera y estrategias de pastoreo rotacional han demostrado reducir las emisiones entéricas de metano en ciertos sistemas productivos.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

La ejecución de la fase experimental del trabajo de investigación comprendió dos fases: la primera correspondió a la caracterización, recopilación de información de manejo nutricional y toma de muestras de alimento en rebaños lecheros comerciales de la CAPV, principalmente que participan en los programas de gestión técnico económica de Álava. Teniendo en cuenta el material recopilado y los resultados obtenidos durante la primera fase, en la segunda fase se planteó una estrategia nutricional de mitigación de las emisiones de metano producidos a nivel de la fermentación ruminal.

4.1 FASE DE CARACTERIZACIÓN

4.1.1 Caracterización de rebaños y recolección de las muestras de alimento

Durante el otoño-invierno 2012-2013 se realizó la identificación y selección de los regaños que forman parte del estudio. Así, en los meses de noviembre - diciembre de 2012 se monitorizaron 16 rebaños en estado productivo de parto (entendido como último mes de gestación), y entre diciembre de 2012 - enero de 2013, se monitorizaron 14 de los 16 de parto, al inicio de lactación (entendida como el primer mes de producción lechera). En cada rebaño se realizó una encuesta a los pastores puntualizando información relacionada con:

- Raza ovina del rebaño
- Manejo alimenticio a lo largo del año: Con la información recopilada, se clasificó el manejo alimenticio como:
 - o Intensivo: Se trata de explotaciones que no realizan pastoreo, mantienen los animales permanentemente estabulados y que por tanto distribuyen la alimentación en pesebre a lo largo de todo el ciclo productivo.

- Convencional: Combinan alimentación en pesebre con periodos de pastoreo en valle durante la primavera, pastan en monte durante el verano y otoño y se mantienen en de estabulación permanente durante el periodo invernal.
 - Ecológico certificado
- Proporción forraje / concentrado en la ración suministrada en los periodos de parto y inicio de lactación
 - Características del forraje: Se diferencié la naturaleza del mismo (pradera, alfafa, veza-avena) y el modo de conservación (heno o ensilado). De igual modo, se especificó en los casos en que la ración se distribuía como mediante un carro mezclador unifeed.
 - Características del pienso: Para cada uno de los casos se indagó sobre el uso de soja como fuente de proteína.

Del mismo modo, de cada rebaño monitorizado en las respectivas etapas productivas, fueron tomadas de manera individual muestras representativas de los forrajes y concentrados empleados. Los forrajes se desecaron en estufa a 60°C durante 48 horas previo envío al laboratorio. Todas las muestras se sometieron a una molienda a un tamaño de partícula de 1 milímetro.

4.1.2 Analítica química de muestras de alimento

A partir de las muestras remitidas al laboratorio de alimentación animal de Neiker-Tecnalia, se determinó el contenido de proteína bruta (PB), grasa bruta (GB), cenizas totales, fibra neutro detergente (FND) y fibra ácido detergente (FAD) mediante espectroscopia en el infrarrojo cercano utilizando un equipo NIRS. A partir de la caracterización nutricional de cada alimento, y con los datos suministrados por el ganadero de la cantidad de cada uno de ellos suministrada en la ración, se calculó la composición

química de la ración total suministrada en cada rebaño en los dos estados fisiológicos monitorizados.

4.1.3 Clasificación de forrajes

Con el fin de obtener un índice que permitiera evaluar la calidad de los recursos forrajeros muestreados en cada explotación, se procedió al cálculo del valor relativo forrajero (VRF) (Calsamiglia, 1997; Jeranyama y García, 2004) mediante las siguientes ecuaciones.

$$\begin{aligned} \text{VRF} &= (\text{IMS} \times \text{DMS}) / 1,29 \\ \text{IMS} (\% \text{ kg PV}) &= 120 / \% \text{ FND} \\ \text{DMS} &= 88,9 - (0,779 \times \% \text{ FAD}) \end{aligned}$$

Donde:

IMS: Ingestión del forraje en Materia Seca

DMS: Digestibilidad de la Materia Seca

PV: Peso Vivo

FND: Fibra Neutro Detergente (%)

FAD: Fibra Ácido Detergente (%)

VRF: Valor Relativo Forrajero

Los forrajes fueron categorizados como excelentes si tenían un VRF calculado superior a 151; de primera si el valor estuvo entre 151 – 125; de segunda entre 124 – 103; de tercera entre 102 – 87; de cuarta entre 86 - 75 y de quinta si fue menor a 75.

4.1.4 Incubaciones *in vitro*

Con el objeto de evaluar la producción de gas correspondiente a cada una de las raciones suministradas en los rebaños, se implementó la técnica de producción de gas en botellas de acuerdo a la metodología propuesta por Theodorou et al. (1994), considerando las modificaciones sugeridas por Mauricio et al. (1999). Las incubaciones se realizaron utilizando como donantes de inóculo ruminal dos ovejas no gestantes ni lactantes de raza Latxa fistuladas en rumen que recibían una ración diaria de forraje *ad libitum*. La recolección del contenido ruminal se realizó antes de la distribución de la ración de la mañana, siendo éste filtrado a través de una doble capa de gasa y almacenado en termos previamente calentados para ser transportado al laboratorio. De cara a la incubación se preparó el medio de cultivo siguiendo el protocolo propuesto por McDougall (1948) (Tabla 1) el cual fue gaseado con CO₂ luego de su elaboración con el fin de garantizar las condiciones de anaerobiosis; el medio se mezcló con el inóculo ruminal en una proporción 1:4 (v/v; fluido ruminal/medio de cultivo).

Tabla 1. Composición química del medio de cultivo

Soluciones		Solución final (ml/l)	Concentración parcial (/l)
<i>Solución de macrominerales</i>			
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	(g)	208,09	9,45
KH ₂ PO ₄	(g)		6,20
MgSO ₄ ·7H ₂ O	(g)		0,60
<i>Solución de tampón</i>			
NH ₄ CO ₃	(g)	208,09	4,00
NaHCO ₃	(g)		35,00
<i>Solución de reductora</i>			
Cisteína - HCL	(g)	62,43	6,25
NaOH 1M	(g)		40
Na ₂ S·10H ₂ O	(g)		6,67
<i>Solución de microminerales</i>			
CaCl ₂ ·2H ₂ O	(g)	0,10	13,20
MnCl ₂ ·4H ₂ O	(g)		10,00
CoCl ₂ ·6H ₂ O	(g)		1,00
FeCl ₃ ·6H ₂ O	(g)		8
<i>Solución de resazurin</i>			
Resazurin	(g)	1,04	0,01
Agua destilada		518,63	

Para la preparación de las muestras a incubar se realizó el cálculo relativo de cada ingrediente en las raciones para una cantidad total de 500 mg. De este modo, la víspera del inicio del ensayo se pesó un total de 500 ± 5 mg MS en botellas de suero de 125 ml, que luego fueron dosificadas con 50 ml de la mezcla fluido ruminal-medio de cultivo. Para cada ración evaluada se realizó una incubación por triplicado en dos series independientes; además se incubaron *blancos*, entendiendo como tales aquellas botellas que contienen la solución el medio de cultivo junto con el inóculo ruminal pero carecían de sustrato a fermentar. Las botellas se cerraron con tapón de butilo, se sellaron herméticamente y se colocaron finalmente en un incubador SELECTA a temperatura constante ($39,0 \pm 0,1$ °C).

Para la determinación de la producción de gas se empleó un transductor de presión Vega Bar 14 y se realizaron lecturas de la presión acumulada en la cabeza de la botella a las 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 24, 30, 36, 48, 72 y 96 horas tras la inoculación, liberando el gas acumulado y agitando las botellas antes de regresarlas al incubador. Los valores de presión registrados se usaron para estimar el volumen de gas acumulado utilizando la fórmula propuesta por Frutos et al. (2002); los valores posteriormente fueron corregidos por el volumen de gas procedente del “blanco”, así como por la cantidad de materia orgánica incubada.

Para la determinación de la digestibilidad de la materia orgánica y de los ácidos grasos volátiles se realizó la incubación de las muestras de interés por 24 horas. La digestibilidad fue determinada siguiendo la metodología propuesta por Pell y Schofield (1993), quienes describen que luego del tiempo de incubación debe procederse a detener la fermentación microbiana mediante la introducción de las botellas por 30 minutos a temperaturas de congelación, para posteriormente aplicar 45 ml de una solución neutro detergente e introducir las en estufa a 105°C durante una hora. Cumplido el tiempo indicado, las muestras se filtran en un equipo digestor de fibra Tecator, realizando un lavado con agua caliente, acetona y etanol con el fin de recoger los residuos en crisoles filtrantes que posteriormente se desecan en estufa a 105°C e incineran en mufla a 550°C. Para la determinación de la producción de ácidos grasos volátiles se implementó la técnica descrita por Jouany (1982), adaptada para columna capilar utilizando ácido metil valérico como patrón interno. Una vez finalizado el tiempo de incubación, se tomó una muestra de cada

botella y se mezcló con solución desproteinizante (4:1 v/v), se centrifugó a 12000 rpm durante 15 minutos, se recogió el sobrenadante en viales de cromatografía y se procedió a la cuantificación de la concentración de AGV (acético, propiónico, butírico, isovalérico, isobutírico) utilizando un cromatógrafo de gases.

4.1.5 Cálculos y análisis estadístico

4.1.5.1 Parámetros de la cinética de producción de gas

Los datos de producción de gas registrados a lo largo de la serie temporal indicada anteriormente se ajustaron al modelo basado en la generalización de Michaelis-Menten descrito por Groot et al. (1996):

$$G = A (1 + B^c / t^c)^{-1}$$

Donde:

G: Producción de gas (ml/g MOI) a tiempo t ,

A: Producción potencial de gas (ml/g MOI)

B: Tiempo de incubación en el que se alcanza una producción de gas equivalente a la mitad del valor potencial (h)

c: Constante adimensional que determina la forma de la curva

Mediante la siguiente fórmula se realizó el cálculo del tiempo de incubación necesario para que se alcance la tasa de producción de gas máxima (Groot *et al.*, 1996)

$$t_{RM} = B (c-1)^{1/c}$$

Partiendo de los parámetros B y c, se realizó el cálculo de la tasa de producción de gas (R_M) a tiempo " t_{RM} " a partir de la siguiente ecuación (Groot *et al.*, 1996)

$$R_M = c t^{c-1} / (B^c + t^c)$$

Finalmente, a partir de los valores de gas registrados a las 24 horas, se realizó el cálculo de emisiones de gas por día tanto por gramo de materia orgánica incubada como por gramo de materia orgánica fermentada.

4.1.5.2 Determinación de la digestibilidad *in vitro* de la materia orgánica

Para determinar la digestibilidad *in vitro*, se cuantificó en primera lugar la materia orgánica del residuo contenido en los crisoles filtrantes:

$$\text{MOR} = \text{CMS} - \text{CC}$$

Donde:

MOR: Materia Orgánica del Residuo (g)

CMS: Crisol más Materia Seca (g)

CC: Crisol más Cenizas (g)

Partiendo del parámetro anterior, se calculó el valor de digestibilidad *in vitro* de la materia orgánica mediante la fórmula

$$\text{DIVMO} = (\text{MOI} - (\text{MOR} - \text{MOB})) / \text{MOI}$$

Donde:

DIVMO: Digestibilidad *in vitro* de la Materia Orgánica (g/g)

MOI: Materia Orgánica Incubada (g)

MOR: Materia Orgánica del Residuo (g)

MOB: Materia Orgánica del Blanco (g)

4.1.5.3 Estimación de parámetros de síntesis microbiana

Para la estimación del factor de partición entre el gas producido por mg de materia orgánica fermentable, síntesis de biomasa microbiana, la eficiencia de síntesis microbiana y el ratio ácidos grasos volátiles totales / materia orgánica fermentable fue necesario calcular la materia orgánica fermentable mediante la siguiente fórmula:

$$\text{MOF} = \text{MOI} * \text{DIMO}$$

Donde:

MOF: Materia Orgánica Fermentable (g)

MOI: Materia Orgánica Incubada (g)

DIMO: Digestibilidad *in vitro* de la Materia Orgánica (g/g)

Del mismo modo, se hizo uso de los valores de gas acumulados durante las primeras 24 horas de incubación realizada para la cinética de producción de gas y se procedió al cálculo de cada parámetro siguiendo las fórmulas propuestas por Blümmel y Lebzien (2001) y Blümmel et al. (2005) que se detallan a continuación:

$$FP_{24} = \text{MOF} / \text{gas}$$

$$SBM_{24} = \text{MOF} - (\text{gas} * 2.2)$$

$$ESM_{24} = (\text{MOF} - (\text{gas} * 2.2)) / \text{MOF}$$

$$\text{AGV} / \text{MOF} = \text{mmol totales AGV} / \text{MOF}$$

Donde

FP₂₄: Factor de Partición a 24 horas (mg MO/ml)

SBM₂₄: Síntesis de Biomasa Microbiana a 24 horas (mg)

ESM₂₄: Eficiencia de Síntesis de Biomasa Microbiana (g/g)

AGV: Ácidos Grasos Volátiles (mmol)

4.1.5.4 Estimación de la producción de metano

A partir de los valores registrados de ácidos grasos volátiles y teniendo en cuenta la ecuación propuesta por Wolin (1960) se determinó la cantidad de metano producida por unidad de MS incubada (mmol de metano/ g MS incubada). Haciendo uso del contenido de materia orgánica de las raciones incubadas y de la cantidad de materia orgánica fermentable, se realizó el cálculo de producción de metano referido a estas dos variables (mmol de metano/ g MOI; mmol de metano/ g MOF).

4.1.5.5 Análisis estadístico

Los resultados de la analítica química de las raciones monitorizadas fueron analizados mediante estadística descriptiva.

Los parámetros de cinética de producción de gas (A, B, c, t_{RM} y R_M), la producción de gas/día por materia orgánica incubada y fermentada, la digestibilidad *in vitro* de la materia orgánica, la producción ácidos grasos volátiles totales e individuales, el ratio ácido acético/propiónico, el factor de partición, la síntesis de biomasa microbiana, la eficiencia de la síntesis de biomasa microbiana, el ratio ácido graso volátil total/materia orgánica fermentable y los valores de metano fueron comparados entre estados fisiológicos así como dentro de las raciones que conforman cada estado. Para el caso de las raciones de parto se realizó la incubación en botellas de 17 muestras por triplicado (16 raciones y un blanco) en dos series independientes que fueron consideradas como la unidad experimental, teniendo un número total de observaciones de 17 (muestras) x 3 (réplicas) x 2 (series) = 102. Para las raciones de inicio de lactación se incubaron 15 muestras por triplicado (14 raciones y un blanco) en dos series independientes que fueron consideradas como la unidad experimental, teniendo para este caso un número total de observaciones de 15 (muestras) x 3 (réplicas) x 2 (series) = 90. Para la comparación entre estados fisiológicos se emplearon los resultados obtenidos para cada parámetro en el análisis de cada estado comparando 16 resultados de datos en las raciones de parto y 14 en inicio de lactación, tomando como unidad experimental al rebaño. El modelo estadístico fue el siguiente:

$$Y = \mu + T + \varepsilon$$

Donde:

Y: Variable dependiente,

μ : Media poblacional,

T: Efecto debido al estado fisiológico o efecto debido a la ración dentro de cada estado, según el caso.

ε : Error residual

Todos los parámetros anteriormente mencionados fueron analizados por unidad experimental mediante un GLM, realizando también un contraste ortogonal de Tukey para la separación de medias mediante el programa estadístico SAS 2003; las diferencias se consideraron estadísticamente significativas con un valor $p < 0,05$.

4.2 FASE DE MITIGACIÓN

Partiendo de los resultados obtenidos en la fase de caracterización en el estado fisiológico de inicio de lactación, se propusieron las siguientes estrategias de mitigación de las emisiones de metano:

- la inclusión de grasa de diferente origen (torta de colza, torta de girasol y grasa de palma).
- la inclusión de dos niveles de grasa en la ración (3% y 5%).
- el empleo de forrajes de distinta calidad en raciones de lactación.

4.2.1 Tratamientos experimentales

Se planteó un diseño multifactorial 2 x 3 x 2 con el fin de realizar la evaluación de la inclusión de dos niveles de grasa (Tabla 2) en una ración constituida por un 60% de forraje y 40% de concentrado, utilizando tres materias primas como fuentes de grasa (torta de colza, torta de girasol y grasa de palma), dos niveles de inclusión de grasa en la ración total (3% y 5%) y dos henos de pradera de distinta calidad (alta y baja). El componente forrajero se seleccionó a partir de los henos y ensilajes muestreados en inicio de lactación provenientes de recursos locales considerando el VRF calculado en la fase anterior.

Tabla 2. Analítica química y clasificación de los forrajes experimentales

Forraje	% MS	% Cen	% PB	% FAD	% FND	VRF	Clasificación
<i>Heno de hierba</i>	87,33	9,72	15,76	31,28	46,73	112,18	Segunda
<i>Heno de hierba</i>	79,58	6,9	9,4	36,13	61,33	73,34	Quinta

MS: Materia seca; Cen: Cenizas; PB: Proteína bruta; FAD: Fibra ácido detergente; FND: Fibra neutro detergente; VRF: Valor relativo forrajero.

Del mismo modo se formularon 6 piensos experimentales isograsos e isocalóricos (1,05 UFL) que cubrieran los requerimientos de proteína bruta para animales en fase de lactación. Los ingredientes utilizados y la analítica química de los piensos pueden verse en la tabla 3.

Tabla 3. Ingredientes y analítica química de los piensos experimentales

Grasa en ración total	Pienso		
	3,1% Girasol	3,1% Colza	3,2% Palma
<i>Ingrediente (% sobre material seca)</i>			
Torta de colza obtenida mediante prensado en frío	/	12	/
Torta de girasol obtenida mediante prensado en frío	12,4	/	
Palma	/		2,2
Torta de soja	6,0	3,6	11,0
Cebada	17,5	19,0	17,2
Maíz	5,6	7,6	5,0
Avena	39,0	39,0	50,0
Habas	14,0	13,4	13,2
Guisante	5,2	5,5	2,0
<i>Composición química (% sobre materia seca)</i>			
Materia orgánica	87,6	87,7	87,7
Proteína bruta	21,2	20,7	19,7
Fibra bruta	11,4	9,6	10,8
Grasa bruta	6,2	6,2	6,6

Grasa en ración total	Pienso		
	4,8% Girasol	4,4% Colza	4,7% Palma
<i>Ingrediente (% sobre material seca)</i>			
Torta de colza obtenida mediante prensado en frío	/	35,0	/
Torta de girasol obtenida mediante prensado en frío	36,1	/	
Palma	/	/	6,3
Torta de soja	/	/	14,5
Cebada	13,2	15,4	/
Maíz	1,0	4,1	/
Avena	44,3	45,0	79,0
Habas	5,7	/	/
<i>Composición química (% sobre materia seca)</i>			
Materia orgánica	87,8	87,6	87,9
Proteína bruta	17,8	18,4	16,0
Fibra bruta	12,9	9,8	12,0
Grasa bruta	10,7	9,5	10,4

4.2.2 Incubaciones *in vitro*, cálculos y análisis estadístico

El procedimiento de las incubaciones *in vitro* se realizó de la manera descrita en el epígrafe 4.1.4. Los parámetros del ajuste de la cinética de producción de gas, la digestibilidad de la materia orgánica, la producción de ácidos grasos volátiles, la estimación del factor de partición, la síntesis de biomasa microbiana, la eficiencia de producción de biomasa microbiana, la relación ácidos grasos volátiles/materia orgánica fermentable y la producción de metano se calcularon tal y como fue descrito en los apartados 4.1.5.1, 4.1.5.2, 4.1.5.3 y 4.1.5.4.

Los tratamientos evaluados y las combinaciones de los mismos fueron incubados por triplicado en dos series independientes consideradas como unidad experimental. El número total de observaciones fueron 2 (Heno) x 3 (Tipo de Grasa) x 2 (Nivel) x 3 (Réplicas) x 2 (Series) = 72. El análisis estadístico de los parámetros estimados de cinética de producción de gas (A, B, c, t_{RM} y R_M), la producción de gas/día por materia orgánica incubada y fermentada, la digestibilidad *in vitro* de la materia orgánica, la producción ácidos grasos volátiles totales e individuales, el ratio ácido acético/propiónico, el factor de partición, la síntesis de biomasa microbiana, la eficiencia de la síntesis de biomasa microbiana, el ratio ácido graso volátil total/materia orgánica fermentable y los valores estimados de metano fueron comparados mediante el modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + N_j + H_k + (T \times N)_{ij} + (T \times H)_{ik} + (N \times H)_{jk} + (T \times N \times H)_{ijk} + \varepsilon_{ijk}$$

Donde:

Y: Variable dependiente,

μ : Media poblacional,

T: Efecto debido tipo de grasa (girasol, colza, palma),

N: Efecto debido al nivel de grasa en la ración total (3% - 5%)

H: Heno de alta o baja calidad

ε : Error residual

Todos los parámetros anteriormente mencionados fueron analizados por unidad experimental mediante un GLM, realizando también un contraste ortogonal para la separación medias mediante el programa estadístico SAS, 2003; las diferencias se consideraron estadísticamente significativas con un valor $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 FASE DE CARACTERIZACIÓN

5.1.1 Raciones de parto

Mediante la encuesta que se aplicó a los ganaderos que participaron en el proyecto, se identificaron las siguientes características del sistema productivo (Tabla 4):

- Raza: la mayoría de los rebaños monitorizados correspondieron a la raza Latxa (n=14 rebaños Latxa, 88% de la muestra), si bien 2 (12%) se basaban en la explotación de animales de la raza Assaf.
- Manejo alimenticio: precisamente los 2 rebaños de la raza Assaf se caracterizaron por un sistema de estabulación permanente a lo largo de todo el ciclo productivo, siendo clasificados como intensivo. Por su parte, de los rebaños Latxa 2 fueron convencional/unifeed, 2 convencional/pienso sin soja, 2 convencional con certificación ecológica, 8 rebaños convencional.
- Proporción forraje/concentrado: salvo en el caso de un rebaño que proporcionaba una ración con relación forraje/concentrado de 33/67, esa relación fue inversa en el resto de las dietas analizadas, de modo que se trabajó principalmente con raciones forrajeras. En particular el rango observado comprendía desde 67/33 hasta 80/20. Como resultado de ello en 6 explotaciones Latxa el contenido de proteína aportado por el recurso forrajero fue mayor que aquel aportado por el concentrado y en otras 6 explotaciones que manejan esta misma raza el contenido de proteína aportado se encontró bastante cercano a las cantidades aportadas por el concentrado (Tabla 4).
- Tipo de forraje empleado y modo de conservación: En los rebaños Latxa, de manera mayoritaria se empleó heno de pradera (n=10 rebaños), si bien hubo un rebaño que proporcionaba heno de veza, otro heno de festuca, otro heno de alfalfa y 1 henolaje de pradera. Por su parte, los rebaños Assaf usaban paja de cereal como único aporte de forraje.

Tabla 4. Caracterización de raciones suministradas durante la fase de preparto en rebaños comerciales de ovino lechero en la CAPV

	RACIONES/REBAÑOS															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
<i>Raza</i> ¹	As	As	Lt													
<i>Manejo alimenticio</i> ²	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2;3	2;3	2;4	2;5	2;5	2;4
<i>F/C</i> ³	33/67	68/32	70/30	70/30	73/27	67/33	70/30	70/30	72/28	75/25	71/29	64/36	72/28	80/20	69/31	76/24
Contenido en proteína bruta (%)																
<i>Forraje</i>	7,5	8,1	10,3	9,6	13,9	7,2	15,7	13,8	7,9	13,8	16,2	16,6	21,3	14,8	15,5	15,5
<i>Concentrado</i>	14,6	19,8	11,9	17,3	17,7	11,9	11,6	16,5	14,8	11,5	12,4	12,4	15,7	17,7	17,7	9,2
Valor Relativo Forrajero																
	63,5	87	92,7	104,1	112,3	95,1	128,4	99,9	91,3	103,1	132,1	138,8	123,9	104,6	104,3	90,7
<i>Clasificación</i>	5 ^a	4 ^a	3 ^a	2 ^a	2 ^a	3 ^a	1 ^a	3 ^a	3 ^a	2 ^a	1 ^a	1 ^a	2 ^a	2 ^a	2 ^a	3 ^a
Tipo de forraje (% del total de forraje ofrecido)																
<i>Paja cereal</i>	100	100	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
<i>Heno pradera</i>	/	/	100	100	100	100	100	/	100	100	/	100	100	100	/	/
<i>Heno veza</i>	/	/	/	/	/	/	/	100	/	/	/	/	/	/	/	/
<i>Heno festuca</i>	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	100	/	/	/	/	/
<i>Heno alfalfa</i>	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	100	/
<i>Henolaje pradera</i>	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	100

¹ As: Assaf; Lt: Latxa; ² 1: Intensivo; 2: Convencional; 3: Unifeed; 4: Pienso sin soja como fuente de proteína; 5: Explotación con certificación de ecológico; ³F/C: Relación forraje/concentrado

5.1.1.1 Analítica química de las muestras de alimento

Como puede observarse en la tabla 5, el contenido de los nutrientes presentó un amplio rango entre las raciones. Los valores calculados de materia seca variaron de 643 a 941 g/kg con un valor promedio de 858 g/kg; la materia orgánica de 587 a 879 g/kg MS con un valor medio de 786,8; el contenido de proteína bruta de 84 a 166 g/kg MS con un valor promedio de 131,7 g/kg MS; la fibra neutro detergente de 25 a 475 g/kg MS con un valor promedio de 375,8 g/kg MS; la fibra ácido detergente de 158 a 283 g/kg MS y el valor de grasa bruta de 1 a 23 g/kg MS.

Tabla 5. Composición química calculada (g/kg) de raciones de parto suministradas en rebaños comerciales de ovino lechero de la CAPV

	RACIONES/REBAÑOS																Prom	DE
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16		
<u>ANALÍTICA QUÍMICA DE LA RACIÓN (g/kg)</u>																		
MS	941	929	867	831	867	869	876	893	842	910	900	819	749	888	904	643	858	73,9
MO	879	857	804	756	787	811	798	820	773	841	815	738	686	805	832	587	786,8	70,8
PB	128	122	103	114	149	83	141	146	93,6	133	166	161	140	143	145	140	131,7	23,3
GB	23	1	10	13	1	10,1	11	10	7	11	9	10	19	8	13	4	10	5,6
FND	240	425	421	390	378	394	327	327	430	425	333	295	360	440	353	475	375,8	61,4
FAD	158	268	260	238	244	247	219	219	279	251	282	181	202	279	276	277	242,5	37,7

MS = Materia seca; MO = Materia orgánica; PB = Proteína bruta; GB = Grasa bruta; FND = Fibra neutro detergente; FAD = Fibra ácido detergente; Prom= Promedio; DE= Desviación estándar

5.1.1.2 Clasificación de forrajes

A través del cálculo del VRF se clasificó la calidad de los forrajes empleados por rebaño. Se identificaron 3 rebaños que emplearon forrajes de primera calidad, 6 de segunda, 5 de tercera, 1 de cuarta y 1 de quinta (Tabla 4).

5.1.1.3 Cinética de producción de gas

En la tabla 6 se detallan los parámetros del ajuste de producción de gas y producción de gas total por día de raciones incubadas de parto. No se encontraron diferencias significativas entre las raciones ($P=0,133$) para el parámetro que describe la producción potencial de gas (“A”), encontrando que los valores registrados se encuentran entre 252,7 y 342,2 ml/g MO. Del mismo modo, el tiempo de incubación necesario para que se alcance la tasa de producción de gas máxima (“ t_{RM} ”) no fue diferente entre raciones ($P=0,963$), registrando valores que oscilaron entre 8,26 y 15,22 h. La tasa de producción de gas máxima (“ R_M ”) y la constante que define la forma de la curva de producción de gas (“c”) tampoco fueron diferentes ($P=0,658$), registrándose valores entre 0,1 y 0,23 h^{-1} para “ R_M ” y entre 1,10 y 1,4 para “c” (Tabla 6).

Para el parámetro que describe el tiempo de incubación en el que se alcanza la mitad del valor potencial de producción de gas (“B”) se observaron valores mayores para la dieta del rebaño 2, cuando se comparó con las dietas de los rebaños 7 ($P=0,040$) y 15 ($P<0,001$). Por su parte los valores registrados para este mismo parámetro en la dieta del rebaño 15 fueron menores cuando se compararon con las raciones de los rebaños 1 ($P=0,040$), 3 ($P=0,020$), 4 ($P=0,009$), 8 ($P=0,010$), 9 ($P=0,008$), 10 ($P=0,008$), 11 ($P=0,003$), 14 ($P=0,002$) y 16 ($P=0,002$) (Tabla 6).

Con respecto a la producción de gas total por día no se observaron diferencias entre raciones al expresar dicha producción como ml/gas por gramo de materia orgánica incubada ($P=0,618$) ni como ml/gas por gramo de materia orgánica fermentada ($P=0,543$) (Tabla 6).

Tabla 6. Parámetros del ajuste de producción de gas y producción de gas total por día de raciones incubadas de preparto suministradas en rebaños comerciales de ovino lechero de la CAPV

	RACIONES/REBAÑOS																EEM	P
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16		
AJUSTES AL MODELO DE PRODUCCIÓN DE GAS																		
<i>A</i>	304,4	327,0	325,4	326,2	342,2	319,9	313,9	287,8	302,3	302,3	339,6	317,2	326,1	301,4	252,7	309,4	22,9	0,133
<i>B</i>	20,7 ^{ab}	26,6 ^a	21,8 ^{ab}	22,7 ^{ab}	19,1 ^{abc}	19,1 ^{abc}	16,5 ^{bc}	21,9 ^{ab}	22,9 ^{ab}	23,0 ^{ab}	24,2 ^{ab}	18 ^{abc}	18,7 ^{abc}	24,6 ^{ab}	10,7 ^c	21,9 ^{ab}	2,4	0,002
<i>c</i>	1,2	1,2	1,2	1,2	1,3	1,2	1,3	1,3	1,1	1,3	1,1	1,2	1,2	1,2	1,4	1,3	0,1	0,658
<i>t_{RM}</i>	12	14,2	11,2	9,9	11,3	8,3	9,8	14,3	11,2	15,2	11,3	8,6	8,9	11,1	9,2	15,9	5,4	0,963
<i>R_M</i>	0,16	0,16	0,15	0,15	0,17	0,12	0,20	0,18	0,14	0,18	0,10	0,14	0,14	0,13	0,23	0,20	0,59	0,778
PRODUCCIÓN TOTAL DE GAS/DÍA																		
<i>ml/g MOI</i>	166,9	155	168	164,6	190,7	178	189	150,2	164,3	154,5	165,7	179,5	184,2	145,4	184,7	162,5	21,42	0,618
<i>ml/g MOF</i>	268,1	233	316	300,1	252,5	325,1	290	256,7	280,6	261,8	283,4	298,8	300,3	257,6	286,8	252	37,45	0,543

“A”: Producción potencial de gas; “B”: Tiempo de incubación en el que se alcanza la mitad del valor potencial; “c”: Constante adimensional que determina la forma de la curva; “t_{RM}”: Tiempo de incubación necesario para que se alcance la tasa de producción de gas máxima; “R”: Tasa de producción de gas máxima; MOI: Materia orgánica incubada; MOF: Materia orgánica fermentable; EEM: Error estándar de la media. Valores medios dentro de una misma fila con superíndices diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (p<0,05)

5.1.1.4 Digestibilidad *in vitro* de la materia orgánica y ácidos grasos volátiles

La digestibilidad media de las raciones empleadas (Tabla 7) fue de 59 g/100g, oscilando entre 53 y 66 g/100g, sin bien no se encontraron diferencias significativas ($P=0,116$) entre las raciones de parto monitorizadas. La producción total de ácidos grasos volátiles totales no fue diferente estadísticamente ($P=0,493$); no fue diferente la proporción de ácido acético ($P=0,997$), propiónico ($P=0,998$), butírico ($P=0,150$), de la sumatoria de isovalérico-isobutírico ($P=0,626$) y la relación ácido acético/ácido propiónico ($P=0,999$) (Tabla 7).

5.1.1.5 Parámetros de síntesis microbiana y producción de metano

En la tabla 8 se detallan los valores de FP_{24} , AGV:MOF, SBM_{24} , ESM_{24} y metano/día estimados *in vitro* a partir de la incubación de raciones de parto. No se encontraron diferencias para FP_{24} ($P=0,958$), AGV:MOF ($P=0,171$), SBM_{24} ($P=0,278$) ni ESM_{24} ($P=0,796$) entre raciones. Tampoco fueron determinadas diferencias entre raciones en producción de diaria de metano producido por gramo de MOF ($P=0,426$) o por gramo de MOI ($P=0,834$).

Tabla 7. Digestibilidad *in vitro* de la materia orgánica (g/100g) y producción de ácidos grasos volátiles de raciones de preparto suministradas en rebaños comerciales de ovino lechero de la CAPV

	RACIONES/REBAÑO																EEM	P
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16		
DIVMO (g/100g)	60,5	60,2	53,22	55,16	66,30	53,63	64,99	56,19	53,63	57,	56,41	61,6	58,83	61,20	63,05	62,08	0,40	0,116
AGV Totales (mmol/500 mg)	4,98	5,08	5,58	5,33	4,85	4,84	4,73	5,25	4,8	5,55	5,18	5,18	4,95	5,90	5,71	5,31	0,49	0,493
AGV Individuales (g/g AGV totales)																		
Acético	0,58	0,59	0,59	0,59	0,58	0,60	0,60	0,59	0,60	0,60	0,59	0,60	0,59	0,59	0,60	0,60	0,02	0,997
Propiónico	0,23	0,23	0,23	0,23	0,23	0,23	0,23	0,23	0,22	0,22	0,23	0,22	0,24	0,23	0,22	0,22	0,01	0,998
Butírico	0,12	0,11	0,11	0,11	0,11	0,10	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	0,005	0,15
Isovalérico+Isobutírico	0,04	0,03	0,03	0,03	0,04	0,03	0,04	0,04	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,002	0,626
Acético:Propiónico	2,55	2,61	2,53	2,53	2,51	2,57	2,64	2,57	2,69	2,67	2,57	2,69	2,41	2,62	2,69	2,68	0,28	0,999

DIVMO: Digestibilidad *in vitro* de la materia orgánica; AGV: Ácidos grasos volátiles; EEM: Error estándar de la media

Tabla 8. FP₂₄ (mg MO/ml), AGV:MOF (mmol/g MO), SBM₂₄ (mg), ESM₂₄ (g/100g) y metano/día estimados *in vitro* a partir de la incubación de raciones de parto suministradas en rebaños comerciales de ovino lechero de la CAPV

RACIONES/REBAÑO																EEM	P
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16		
FP₂₄¹ (mg MO/ml)																	
3,7	4	3,5	3,2	3,8	3,7	3,4	3,9	3,4	3,7	3,6	3,4	3,4	3,9	3,5	4,1	0,59	0,958
AGV:MOF² (mmol/ g MO)																	
18	17,5	18,1	20,7	18,2	16,9	18,6	19,9	19,4	19,2	24,0	21,7	21,0	21,6	22,4	22,7	2,32	0,171
SBM₂₄³ (mg)																	
112,8	147,9	131,0	123,2	97,4	132,2	93,8	83,1	107,5	112,2	62,8	73,9	88,6	98,5	106,7	97,9	27,17	0,278
ESM₂₄³ (g/100g)																	
41,0	51,9	42,6	44,3	35,5	45,2	37,5	32,5	43,4	38,2	29,4	32,4	37,3	36,1	42,4	40,0	0,90	0,796
METANO DÍA mmol/g Fermentable																	
5,3	5,2	5,3	6,2	5,4	5,0	5,5	5,9	5,9	5,8	7,1	6,5	6,4	6,3	6,3	6,8	0,85	0,426
METANO DÍA mmol/g Incubado																	
3,3	3,5	3,7	3,6	3,3	3,2	3,3	3,7	3,3	3,7	3,8	3,6	3,5	4,1	3,9	3,6	3,64	0,834

¹FP: Factor de partición; ²AGV:MOF: Ratio ácido graso volátil total: Materia orgánica fermentable; ³SBM: Síntesis de biomasa microbiana; ⁴ESM: Eficiencia de síntesis microbiana; EEM: Error estándar de la Media

5.1.2 Raciones de inicio de lactación

A través de la encuesta que se aplicó a los ganaderos, se identificaron las siguientes características de los sistemas productivos en esta fase (Tabla 9):

- Raza: Se monitorizó la misma muestra de rebaños considerados durante la fase de parto, salvo 1 Assaf y 1 rebaño Latxa. Por tanto, el conjunto de rebaños estuvo constituido por 1 rebaño Assaf y 13 rebaños de raza Latxa.
- Proporción forraje/concentrado: Se identificaron raciones en las que prevaleció la cantidad de forraje ofrecida, encontrando 1 rebaño con 72/28, 2 rebaños con 70/30 y 2 rebaños con 68/32, aunque también se identificaron raciones con relaciones medias (50/50 1 rebaño, 48/52 1 rebaño) o de menos aporte de forraje, como en el caso de un rebaño con 40/60.
- Manejo alimenticio: El manejo alimenticio de los rebaños monitorizados fue el mismo indicado que para el caso de parto, salvo 1 rebaño Assaf menos que implementaba un manejo intensivo y un rebaño Latxa de manejo convencional con certificación ecológica.
- Tipo de forraje empleado y modo de conservación: La mayoría de los rebaños aportaban al menos dos forrajes diferentes en esta etapa productiva, siendo la base principalmente heno (7 rebaños) o heno de pradera (8 rebaños), utilizando la combinación de ambos en 2 rebaños. En el resto de los rebaños que usaban heno de alfalfa como forraje principal, 2 únicamente usaban esta como aporte forrajero único y el resto lo complementaba con ensilado de maíz o heno de festuca. En el caso de los que utilizaban heno de pradera, 2 emplearon heno de veza como forraje adicional; existió sólo 1 rebaño que utilizó henolaje de hierba de pradera como forraje único.

Tabla 9. Caracterización de raciones suministradas durante la fase de inicio de lactación en rebaños comerciales de ovino lechero en la CAPV

	RACIONES/REBAÑO													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
<i>Raza</i> ¹	As	Lt	Lt	Lt										
<i>Manejo alimenticio</i> ²	1;3	2	2	2	2	2	2	2	2	2;3	2	2;4	2;5	2;5
<i>F/C</i> ³	50/50	61/39	40/60	63/37	70/30	63/37	68/32	63/37	60/40	48/52	60/40	70/30	72/28	68/32
Contenido en proteína bruta (%)														
<i>Forraje</i>	13,4	13,8	19,2	14,7	8,8	15,9	9,4	15,5	13,8	16,5	13,9	15,2	17,0	10,9
<i>Concentrado</i>	22,4	18,1	17,3	22,8	16,3	21,4	19,3	13,0	16,9	17,2	20,0	11,6	11,6	15,8
Valor Relativo Forrajero														
	147,5	106,9	127,0	119,7	85,7	116,3	117,6	95,7	93,1	175,0	116,7	151,1	159,3	64,5
<i>Clasificación</i> ⁴	1 ^a	2 ^a	1 ^a	2 ^a	4 ^a	2 ^a	2 ^a	3 ^a	3 ^a	1 ^a	2 ^a	Exc ⁴	Exc ⁴	5 ^a
Tipo de forraje (% del total de forraje ofrecido)														
<i>Heno alfalfa</i>	46,0	36,8	100	/	/	/	/	47,0	/	100	/	100	83,3	/
<i>Ensilaje de maíz</i>	54,0	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
<i>Heno de pradera</i>	/	31,6	/	51,9	100	63,5	100	53,0	100	/	/	/	16,7	/
<i>Heno de festuca</i>	/	31,6	/	/	/	/	/	/	/	/	100	/	/	/
<i>Heno de veza</i>	/	/	/	48,1	/	36,5	/	/	/	/	/	/	/	/
<i>Henolaje de hierba</i>	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	100

¹ As: Assaf, Lt: Latxa; ² 1: Intensivo, 2: Convencional, 3: Unifeed, 4: Pienso sin soja como fuente de proteína, 5: Explotación con certificación de ecológico; ³ F/C: Relación forraje/concentrado; ⁴ Exc: Excelente

5.1.2.1 Analítica química de las muestras de alimento

Como puede observarse en la tabla 10, el contenido de materia seca se encontró entre 592 g/kg y 911 g/kg con un valor promedio de 844, el contenido de materia orgánica entre 505 g/kgMS y 833 g/kgMS, el contenido en proteína cruda entre 111 g/kgMS y 195 g/kgMS, la grasa bruta entre 1 g/kgMS y 38 g/kgMS, la fibra neutro detergente entre 155 g/kgMS y 446 g/kgMS y la fibra ácido detergente entre 117 g/kgMS y 244 g/kgMS.

Tabla 10. Composición química calculada (g/kg) de raciones de inicio de lactación suministradas en rebaños comerciales de ovino lechero de la CAPV

	RACIONES/REBAÑOS														Prom	DE
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14		
ANALÍTICA QUÍMICA DE LA RACIÓN (g/kg)																
<i>MS</i>	592	905	911	888	704	860	863	891	911	903	918	900	813	757	844,0	96,6
<i>MO</i>	505	823	833	816	634	783	780	803	840	802	850	825	731	691	765,4	96,8
<i>PB</i>	195	141	181	176	111	179	161	160	157	169	163	141	154	125	158,1	22,7
<i>GB</i>	1	17	29	24	10	25	1	12	11	1	38	14	12	9	14,6	11,1
<i>FND</i>	404	302	155	290	446	283	434	330	332	330	298	260	267	415	324,7	79,3
<i>FAD</i>	253	220	117	195	283	190	275	234	217	244	177	194	198	242	217,1	43,3

MS = Materia seca; MO = Materia orgánica; PB = Proteína bruta; GB = Grasa bruta; FND = Fibra neutro detergente; FAD = Fibra ácido detergente; Prom= Promedio; DE= Desviación estándar

5.1.2.2 Clasificación de Forrajes

A través del cálculo del VRF se clasificó la calidad de los forrajes empleados por rebaño. Se identificaron 2 explotaciones que suministraron forrajes de calidad excelente, 3 de primera, 5 de segunda, 2 de tercera, 1 de cuarta y 1 de quinta (Tabla 9).

De acuerdo al VRF obtenido para el forraje o la combinación de los forrajes empleados, se observa que en el 36% de los rebaños era de alta calidad, destacando que en el 50% de los rebaños se empleó forraje de calidad media e incluso 1 heno y 1 henolaje de hierba de pradera de baja calidad.

5.1.2.3 Cinética de producción de gas

Como puede observarse en la tabla 11, al comparar los parámetros del ajuste de producción de gas de las 14 raciones monitorizadas se encontraron diferencias en todos los parámetros

evaluados (“A”, “B”, “c”, “ t_{RM} ” y “ R_M ”). La producción potencial de gas (“A”) fue mayor en la ración 14 con respecto a los valores presentados en la ración 1 ($P=0,020$) y 12 ($P=0,050$). El tiempo necesario en el que se alcanza la mitad del valor potencial de producción de gas (“B”) fue menor en la ración 10 con respecto a los valores presentados por la dietas 5 ($P=0,002$), 9 ($P=0,040$) y 11 ($P=0,040$). La constante adimensional que determina la forma de la curva (“c”) presentó un mayor valor en la ración 14 en relación con los valores registrados en las raciones 2 ($P=0,030$), 7 ($P=0,010$) y 11 ($P=0,050$). El tiempo de incubación necesario para que se alcance la tasa de producción de gas máxima (“ t_{RM} ”) fue mayor en la ración 9 con respecto a la ración 2 ($P=0,020$) y 7 ($P=0,005$), mientras que la ración 14 presentó mayores valores con respecto a la ración 2 ($P=0,005$), 4 ($P=0,030$), 6 ($P=0,020$), 7 ($P=0,001$), 10 ($P=0,010$) y 11 ($P=0,010$). Finalmente, el parámetro que indica la tasa de producción de gas máxima (R_M) para la ración 14 fue diferente con respecto a las raciones 2 ($P=0,030$), 7 ($P=0,010$) y 11 ($P=0,060$).

La producción total de gas/día por gramo de materia orgánica incubada fue menor en la ración 5 con respecto a las raciones 2 ($P=0,010$), 3 ($P<0,001$), 4 ($P<0,001$), 6 ($P=0,01$), 7 ($P=0,030$), 10 ($P=0,005$) y 14 ($P=0,001$). Del mismo modo, las raciones 3 y 4 presentaron valores mayores con respecto a las raciones 9 ($P=0,010 - 0,009$ respectivamente), 11 ($P=0,02 - 0,02$ respectivamente), 12 ($P=0,02 - 0,01$ respectivamente) y 13 ($P=0,04 - 0,04$ respectivamente). Al expresar la producción total de gas/día por gramo de materia orgánica fermentada no se encontraron diferencias entre raciones ($P=0,260$), aunque cabe destacar que dichos valores incrementan en todos los casos con respecto a aquellos registrados en la producción total por gramo de materia orgánica incubada.

5.1.2.4 Digestibilidad in vitro de la materia orgánica y ácidos grasos volátiles

La digestibilidad media de las raciones empleadas fue de 64 g/100g, oscilando entre el 56 g/100g y el 68 g/100g. Como puede observarse en la tabla 12, la digestibilidad de la materia orgánica no fue diferente entre las raciones monitorizadas muestreadas ($P=0,390$). Para la

cantidad de cantidad de ácidos grasos volátiles totales entre raciones, a pesar de registrarse un valor de $P=0,010$, no se encontraron diferencias al observar el valor de P registrado para cada ración. La proporción de ácido acético fue mayor en la ración 10 respecto a las raciones 3 ($P=0,008$), 4 ($P=0,030$) y 5 ($P=0,030$). Por su parte, la proporción de ácido propiónico ($P=0,392$), butírico ($P=0,344$), la suma de isovalérico e isopropiónico ($P=0,159$) y la tasa acético:propiónico ($P=0,095$) no fueron diferentes entre las raciones raciones (Tabla 12).

5.1.2.5 Parámetros de síntesis microbiana y producción de metano

En la tabla 13 se detallan los valores obtenidos en los parámetros de síntesis microbiana y de producción de metano. El FP_{24} no fue diferente entre raciones ($P=0,320$), mientras que la relación de AGV:MOF fue mayor en la ración 1 con respecto a las raciones 6 ($P=0,020$), 9 ($P=0,02$), 10 ($P=0,030$), 11 ($P=0,011$) y 12 ($P=0,011$). La SBM_{24} y ESM_{24} no fueron diferentes ($P=0,251$, $P=0,348$ respectivamente). La producción de metano por gramo de materia orgánica fermentable fue mayor para la ración 1 con respecto a la ración 13 ($P=0,050$), mientras que por gramo de materia orgánica incubada fue mayor en la ración 3 con respecto a la ración 13 ($P=0,050$).

Tabla 11. Parámetros del ajuste de producción de gas y producción de gas total por día de raciones de incubadas de inicio de lactación suministradas en rebaños comerciales de ovino lechero de la CAPV

	RACIONES/REBAÑO														EEM	P
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14		
AJUSTES AL MODELO DE PRODUCCIÓN DE GAS																
<i>A</i>	243,9 ^b	288,8 ^a	265,1 ^{ab}	282,8 ^{ab}	276,6 ^{ab}	270,5 ^{ab}	275,8 ^{ab}	258,7 ^{ab}	267,8 ^{ab}	256,5 ^{ab}	273,5 ^{ab}	250,1 ^b	250,8 ^{ab}	292,6 ^a	10,65	0,008
<i>B</i>	16,8 ^{bc}	19,6 ^{abc}	16,4 ^{bc}	17,9 ^{bc}	22,9 ^a	17,7 ^{bc}	18,2 ^{bc}	17,5 ^{bc}	20,9 ^{ab}	15,9 ^c	20,5 ^{ab}	18,0 ^{bc}	17,5 ^{bc}	19,9 ^{abc}	1,22	0,002
<i>c</i>	1,6 ^{ab}	1,3 ^b	1,6 ^{ab}	1,5 ^{ab}	1,5 ^{ab}	1,5 ^{ab}	1,3 ^b	1,5 ^{ab}	1,6 ^{ab}	1,5 ^{ab}	1,4 ^b	1,5 ^{ab}	1,6 ^{ab}	1,8 ^a	0,100	0,018
<i>t_{RM}</i>	20,2 ^{ab}	14,7 ^b	18,9 ^{ab}	17,3 ^b	21,6 ^{ab}	16,7 ^b	12,5 ^b	19,3 ^{ab}	25,3 ^a	16,4 ^b	16,1 ^b	19,1 ^{ab}	19,3 ^{ab}	27,5 ^a	2,4	0,001
<i>R_M</i>	0,33 ^{ab}	0,21 ^b	0,32 ^{ab}	0,27 ^{ab}	0,26 ^{ab}	0,26 ^{ab}	0,19 ^b	0,29 ^{ab}	0,33 ^{ab}	0,29 ^{ab}	0,23 ^b	0,29 ^{ab}	0,30 ^{ab}	0,38 ^a	0,03	0,019
PRODUCCIÓN TOTAL DE GAS/DÍA																
<i>ml/g MOI</i>	156,1 ^{abcd}	163,1 ^{abc}	170,3 ^a	170,7 ^a	143,9 ^d	164,1 ^{abc}	161,28 ^{abc}	158,1 ^{abcd}	150,2 ^c	165,7 ^{abc}	151,9 ^c	151,9 ^c	153,8 ^b	168,7 ^{ab}	4,11	0,0002
<i>ml/g MOF</i>	264,2	260,6	240,6	265,0	259,9	242,7	274,7	253,6	232,6	248,2	220,6	234,7	236,2	241,0	18,6	0,263

“A”: Producción potencial de gas; “B”: Tiempo de incubación en el que se alcanza la mitad del valor potencial; “c”: Constante adimensional que determina la forma de la curva; “R”: Tasa de producción de gas máxima; “t_{RM}”: Tiempo de incubación necesario para que se alcance la tasa de producción de gas máxima; MOI: Materia orgánica incubada; MOF: Materia orgánica fermentable
EEM: Cuadrados medios del error. Valores medios dentro de una misma fila con superíndices diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (p<0,05)

Tabla 12. Digestibilidad *in vitro* de la materia orgánica (g/100g) y producción de ácidos grasos volátiles de raciones de inicio de lactación suministradas en rebaños comerciales de ovino lechero de la CAPV

	RACIONES/REBAÑO														EEM	P
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14		
DIVMO (g/100g)	56,18	63,48	62,94	62,94	64,46	56,43	68,67	59,07	62,13	68,21	68,66	68,99	67,20	67,13	0,04	0,396
AGV Totales (mmol/500 mg)	5,90	5,83	6	5,1	4,70	4,85	4,78	4,84	4,59	4,79	4,66	4,67	4,48	4,67	0,391	0,013
AGV Individuales (g/g AGV totales)																
Acético	0,57 ^{ab}	0,57 ^{ab}	0,56 ^b	0,56 ^b	0,56 ^b	0,57 ^{ab}	0,57 ^{ab}	0,57 ^{ab}	0,57 ^{ab}	0,59 ^a	0,57 ^{ab}	0,58 ^{ab}	0,57 ^{ab}	0,57 ^{ab}	0,01	0,027
Propiónico	0,18	0,18	0,17	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	0,004	0,392
Butírico	0,12	0,12	0,13	0,13	0,13	0,13	0,12	0,12	0,13	0,11	0,13	0,12	0,12	0,13	0,008	0,344
Isovalérico+Isobutírico	0,03	0,04	0,04	0,03	0,04	0,03	0,03	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,002	0,159
Acético:Propiónico	3,16	3,16	3,26	3,11	3,12	3,18	3,18	3,13	3,28	3,41	3,22	3,3	3,32	3,22	0,086	0,095

DIVMO: Digestibilidad *in vitro* de la materia orgánica; AGV: Ácidos grasos volátiles. EEM: Error estándar de la media; Valores medios dentro de una misma fila con superíndices diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (p<0,05)

Tabla 13. FP₂₄ (mg MO/ml), AGV:MOF (mmol/g MO), SBM₂₄ (mg) y ESM₂₄ (g/g) y producción de metano/día estimados *in vitro* a partir de la incubación de raciones de inicio de lactación suministradas en rebaños comerciales de ovino lechero de la CAPV

RACIONES/REBAÑOS														EEM	P
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14		
FP₂₄¹ (mg MO/ml)															
3,68	3,75	4,16	3,78	3,93	4,19	3,67	3,85	4,33	4,03	4,54	4,38	4,23	4,23	0,33	0,320
AGV:MOF² (mmol/ g MO)															
24,22 ^a	20,77 ^{ab}	17,85 ^{abc}	18,01 ^{abc}	17,82 ^{abc}	15,6 ^{bc}	18,46 ^{abc}	17,58 ^{abc}	15,39 ^{bc}	16,1 ^{bc}	14,61 ^c	15,6 ^{bc}	15,19 ^{bc}	20,43 ^{abc}	1,54	0,008
SBM₂₄³ (mg)															
105,37	108,33	147,70	112,69	114,65	139,21	97,21	113,74	137,88	125,06	154,87	138,49	133,24	136,71	21,28	0,251
ESM₂₄⁴ (g/100g)															
42,1	41,6	47,6	41,6	45,0	47,4	39,4	42,6	48,8	45,1	51,4	49,6	47,8	46,0	0,40	0,348
Metano24 mmoldía/g fermentable															
7,2 ^a	6,7 ^{ab}	6,2 ^{ab}	5,8 ^{ab}	5,7 ^{ab}	5,0 ^{ab}	5,9 ^{ab}	5,6 ^{ab}	5,0 ^{ab}	5,2 ^{ab}	4,9 ^{ab}	5,1 ^{ab}	4,8 ^b	5,7 ^{ab}	0,62	0,05
Metano24 mmoldía/g incubado															
4,1 ^{ab}		4,4 ^a	3,7 ^{ab}	3,2 ^{ab}	3,4 ^{ab}	3,5 ^{ab}	3,4 ^{ab}	3,3 ^{ab}	3,5 ^{ab}	3,4 ^{ab}	3,3 ^{ab}	3,1 ^b	3,3 ^{ab}	0,33	0,030

FP: Factor de partición; ²AGV:MOF: Ratio ácido graso volátil total: Materia orgánica fermentable; ³SBM: Síntesis de biomasa microbiana; ⁴ESM: Eficiencia de síntesis microbiana; EEM: Error estándar de la media. Valores medios dentro de una misma fila con superíndices diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (p<0,05)

5.1.3 Comparación entre estados fisiológicos (preparto vs. inicio de lactación)

5.1.3.1 Cinética de producción de gas

Como puede observarse en la tabla 14, los parámetros del ajuste de producción de gas fueron diferentes entre las etapas productivas consideradas: final de gestación e inicio de lactación. Tanto el parámetro “A” como el parámetro “B” fueron mayores en preparto que en inicio de lactación ($P < 0,001$ y $P = 0,017$, respectivamente). El parámetro “ t_{RM} ”, “ R_M ” y “c” fueron menores para las raciones de preparto que para las de inicio de lactación ($P < 0,001$ para todos los casos mencionados)

La producción de gas total por día referido como ml de gas por gramo de materia orgánica incubada o fermentada fue mayor en las raciones incubadas de preparto en relación con las de inicio de lactación ($P = 0,043$ y $P = 0,001$, respectivamente). La producción de metano referida mmol/ g MOI o mmol/ g MOF no fue diferente entre las raciones incubadas en los dos estados fisiológicos monitorizados ($P = 0,878$ y $P = 0,206$, respectivamente).

Tabla 14. Análisis del efecto de la etapa productiva sobre los parámetros del ajuste de producción de gas, producción de gas total por día y producción de metano de raciones incubadas de parto e inicio de lactación suministradas en rebaños comerciales de ovino lechero de la CAPV

	PREPARTO	LACTACIÓN	EEM	P
AJUSTES AL MODELO DE PRODUCCIÓN DE GAS				
<i>A</i>	312,98 ^a	268,11 ^b	19,03	<0,001
<i>B</i>	21,84 ^a	18,57 ^b	3,45	0,017
<i>c</i>	1,25 ^a	1,54 ^b	0,10	<0,001
<i>t_{RM}</i>	11,41 ^a	18,93 ^b	3,27	<0,001
<i>R_M</i>	0,16 ^a	0,28 ^b	0,04	<0,001
PRODUCCIÓN DE GAS TOTAL POR DÍA				
<i>ml/g MOI</i>	169,23 ^a	159,87 ^b	11,89	0,043
<i>ml/g MOF</i>	278,77 ^a	248,18 ^b	22,35	0,001
PRODUCCIÓN DE METANO				
<i>mmoldía/gr fermentable</i>	5,97	5,65	0,66	0,206
<i>mmol día/gr incubado</i>	3,56	3,57	0,33	0,878

“A”: Producción potencial de gas; “B”: Tiempo de incubación en el que se alcanza la mitad del valor potencial; “c”: Constante adimensional que determina la forma de la curva; “R”: Tasa de producción de gas máxima; “t_{RM}”: Tiempo de incubación necesario para que se alcance la tasa de producción de gas máxima; MOI: Materia orgánica incubada; MOF Materia orgánica fermentable. EEM: Error estándar de la media. Valores medios dentro de una misma fila con superíndices diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (p<0,05).

5.1.3.2 Digestibilidad *in vitro* de la materia orgánica y ácidos grasos volátiles

Como se detalla en la tabla 15, la digestibilidad *in vitro* fue mayor en las raciones monitorizadas de inicio de lactación que en las de parto (P=0,005). La producción de ácidos grasos volátiles totales fueron mayores en las raciones de parto (P=0,002), siendo mayor la cantidad de ácido propiónico registrada (P<0,001) y menor la de acético

(P=0,003), butírico (P<0,001), isovalérico+isobutírico (P=0,001) y el ratio acético:propiónico (P<0,001).

Tabla 15. Análisis del efecto de la etapa productiva sobre la producción de ácidos grasos volátiles en el fluido ruminal durante la incubación *in vitro* de raciones de preparto y inicio de lactación suministradas en rebaños comerciales de ovino lechero de la CAPV

	PREPARTO	LACTACIÓN	EEM	P
DIVMO¹ (g/100g)	59,12 ^a	64,23 ^b	0,04	0,005
AGV² Totales (mmol/500 mg)	5,19 ^a	4,66 ^b	0,41	0,002
AGV² (g/g AGV totales)				
<i>Acético</i>	0,59 ^a	0,60 ^b	0,01	0,003
<i>Propiónico</i>	0,23 ^a	0,19 ^b	0,004	<0,001
<i>Butírico</i>	0,11 ^a	0,13 ^b	0,006	<0,001
<i>Isovalérico + isobutírico</i>	0,03 ^a	0,04 ^b	0,002	0,001
<i>Acético: propiónico</i>	2,59 ^a	3,22 ^b	0,08	<0,001

¹DIVMO: Digestibilidad *in vitro* de la materia orgánica; ²AGV: Ácido graso volátil. EEM: Error estándar de la media. Valores medios dentro de una misma fila con superíndices indican diferencias estadísticamente significativas (p<0,05)

5.1.3.3 Parámetros de síntesis microbiana

Como puede observarse en la tabla 16, las raciones de inicio de lactación presentaron mayores valores de FP₂₄ (P=0,009), SBM₂₄ (P=0,010) y ESM₂₄ (P=0,002) que las raciones de preparto, mientras que el valor registrado para el ratio AGV:MOF fue mayor en preparto que en inicio de lactación (P=0,005).

Tabla 16. Análisis del efecto de la etapa productiva sobre FP₂₄ (mg MO/ml), AGV:MOF (mmol/g MO), SMB₂₄(mg) y ESM₂₄ (g/g) estimados in vitro a partir de la incubación de raciones de parto y inicio de lactación suministradas en rebaños comerciales de ovino lechero de la CAPV

	PREPARTO	LACTACIÓN	EEM	P
FP ¹ (mg MO/ml)	3,66 ^a	4,04 ^b	0,27	0,009
AGV:MOF ² (mmol/ g MO)	19,84 ^a	17,33 ^b	2,15	0,005
SBM ³ (mg)	104,37 ^a	126,08 ^b	20,48	0,010
ESM ⁴ (g/100g)	39,0 ^a	45,0 ^b	0,50	0,002

¹FP: Factor de partición; ²AGV:MOF (mmol/g MO): Ratio ácido graso volátil total/materia orgánica fermentable; ³SBM: Síntesis de biomasa microbiana; ⁴ESM: Eficiencia de síntesis de biomasa microbiana. EEM: Error estándar de la media. Valores medios dentro de una misma fila con superíndices diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (p<0,05).

5.2 FASE MITIGACIÓN

5.2.1 Cinética de producción de gas

De acuerdo al análisis estadístico aplicado y tal y como se indica en la tabla 17, no se detectó un efecto significativo de ninguna de las interacciones estudiadas para ninguno de los parámetros que describen la cinética de producción de gas. El tipo de grasa afectó el parámetro “B”, siendo mayor para las raciones que contenían torta de girasol en relación con las que contenían torta de colza (P=0,042), sin encontrarse diferencias entre torta girasol y grasa de palma o entre grasa de palma y torta de colza. Los niveles de grasa evaluados determinaron diferencias significativas para los parámetros “c” (P=0,021), “t_{RM}” (p=0,003) y “R_M” (p=0,007) siendo mayores en todos los casos en el nivel de 3% con respecto a 5%.

El tipo de heno empleado afectó todos los parámetros del ajuste de la cinética de producción de gas, siendo “A” y “B” menores en el heno de alta calidad con respecto al de baja calidad ($P < 0,001$ para ambos casos), mientras que los valores registrados de “c” ($P < 0,001$), “ t_{RM} ” ($P = 0,004$) y “ R_M ” ($P < 0,001$) fueron mayores en el heno de baja calidad con respecto al de alta calidad. Como se detalla en la tabla 18, no se detectó un efecto significativo de ninguna de las interacciones estudiadas para la producción de gas por gramo de materia orgánica incubada. El efecto individual del tipo de grasa determinó diferencias en la producción de gas por unidad de MOI, siendo mayor para las raciones incubadas con torta de colza como fuente de grasa con respecto a aquellas con torta de girasol ($P = 0,012$) y con grasa de palma ($P = 0,025$). Para la calidad del heno, el parámetro indicado fue mayor en el heno de alta calidad en relación con el de baja ($P < 0,001$).

Tabla 17. Efecto del tipo de forraje, tipo de grasa y nivel de inclusión de grasa en la ración total sobre los parámetros del ajuste de producción de gas de las raciones experimentales incubadas.

	A	B	c	t_{RM}	R_M
TIPO DE GRASA					
<i>Torta de girasol</i>	284,42	25,23 ^a	1,31	14,10	0,18
<i>Torta de colza</i>	283,13	22,84 ^b	1,34	13,91	0,19
<i>Grasa de palma</i>	282,95	24,47 ^{ab}	1,32	14,84	0,19
NIVEL DE INCLUSIÓN DE GRASA					
3%	287,88	24,83	1,36 ^a	15,92 ^a	0,21 ^a
5%	279,12	23,53	1,29 ^b	12,65 ^b	0,17 ^b
HENO					
<i>Alta calidad</i>	258,17 ^a	17,36 ^a	1,46 ^a	15,83 ^a	0,26 ^a
<i>Baja calidad</i>	308,83 ^b	31,00 ^b	1,19 ^b	12,74 ^b	0,12 ^b
EFECTOS					
<i>Tipo</i>	0,967	0,047	0,415	0,669	0,706
<i>Nivel</i>	0,112	0,092	0,021	0,003	0,007
<i>Heno</i>	<0,001	<0,001	<0,001	0,004	<0,001
<i>Tipo*nivel</i>	ns	ns	ns	ns	ns
<i>Tipo*heno</i>	ns	ns	ns	ns	ns
<i>Nivel*heno</i>	ns	ns	ns	ns	ns
<i>Tipo*nivel*heno</i>	ns	ns	ns	ns	ns
EEM	12,50	1,73	0,05	2,16	0,02

“A”: Producción potencial de gas; “B”: Tiempo de incubación en el que se alcanza la mitad del valor potencial; “c”: Constante adimensional que determina la forma de la curva; “R”: Tasa de producción de gas máxima; “t_{RM}”: Tiempo de incubación necesario para que se alcance la tasa de producción de gas máxima. EEM: Error estándar de la media. Valores medios dentro de una misma fila con superíndices diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (p<0,05); ns: diferencias no significativas

Tabla 18. Efecto del tipo de forraje, tipo de grasa y nivel de inclusión de grasa en la ración total sobre la producción de gas/día por gramo de materia orgánica incubada de raciones experimentales.

		<i>ml/g MO incubada</i>
TIPO DE GRASA		
	<i>Torta de girasol</i>	142,3 ^b
	<i>Torta de colza</i>	149,9 ^a
	<i>Grasa de palma</i>	143,2 ^b
NIVEL DE INCLUSIÓN DE GRASA		
	3%	145,17
	5%	145,16
HENO		
	<i>Alta calidad</i>	156,86 ^a
	<i>Baja calidad</i>	133,47 ^b
EFECTOS		
	<i>Tipo</i>	0.009
	<i>Nivel</i>	0.995
	<i>Heno</i>	<,001
	<i>Tipo*nivel</i>	ns
	<i>Tipo*heno</i>	ns
	<i>Nivel*heno</i>	ns
	<i>Tipo*nivel*heno</i>	ns
EEM		4,42

EEM: Error estándar de la media. Valores medios dentro de una misma fila con superíndices diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$); ns: diferencias no significativas

Finalmente, al referir la producción de gas diaria por gramo de materia orgánica fermentable se encontró una interacción significativa entre el nivel de grasa y el tipo de heno ($P=0,025$), donde para raciones con 3% y 5% de grasa no existen diferencias cuando el componente forrajero es un heno de alta calidad ($P=0,311$), mientras que un nivel de grasa en la dieta del 5% se encontró más gas por g de MOF en para el heno de baja calidad en comparación con el de alta ($P=0,006$) (Figura 2).

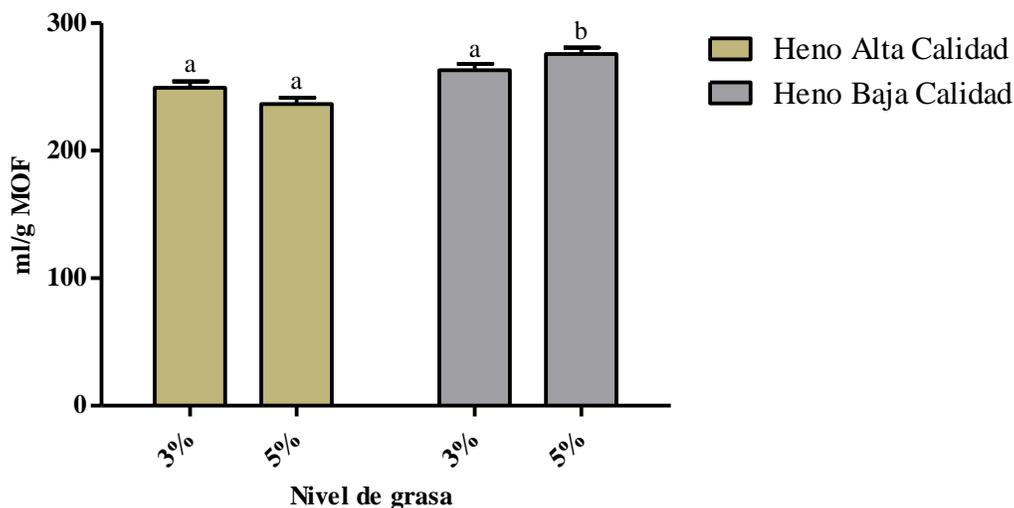


Figura 2. Efecto del tipo de heno y el nivel de grasa en las raciones experimentales sobre la producción de gas/día por gramo de materia orgánica fermentable.

5.2.2. Digestibilidad *in vitro* de la materia orgánica

Se encontró un efecto significativo de la interacción entre el nivel de grasa por el tipo de grasa ($P=0,029$), de la calidad del heno por el tipo de grasa ($P=0,028$) y del nivel de grasa por el tipo de heno ($P=0,056$). Como puede observarse en la figura 3, mientras que al incluir grasa en un 3% no se encontraron diferencias significativas entre tipo de grasa, en la relación 5% sí se encontró una menor digestibilidad con grasa de palma en comparación con torta de colza ($P=0,006$) y torta de girasol ($P=0,004$). Por otra parte, mientras que al incubar heno de alta calidad no se determinaron diferencias significativas entre tipos de grasa en los valores de DIVMO, ésta fue menor en las raciones incubadas con heno de baja calidad y grasa de palma en comparación con torta de colza ($P=0,002$) y torta de girasol ($P=0,013$) (Figura 4).

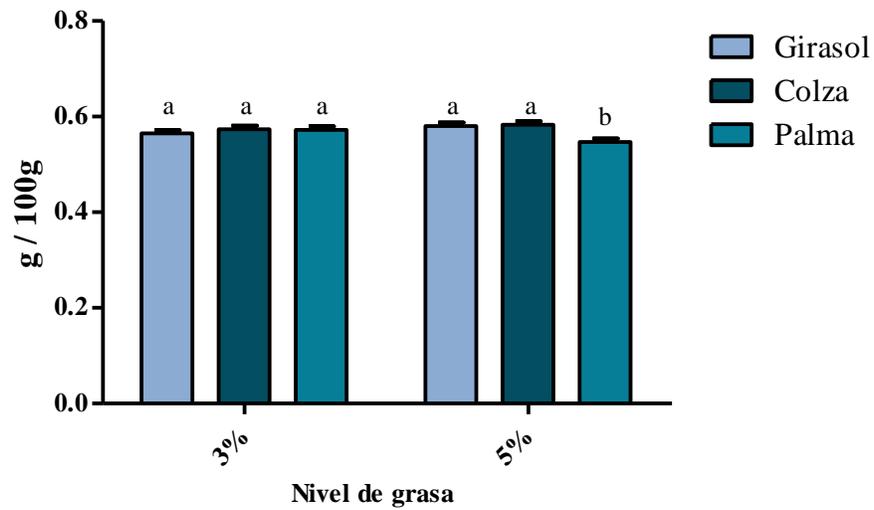


Figura 3. Efecto del tipo y nivel de grasa en las raciones experimentales sobre digestibilidad verdadera *in vitro* de la materia orgánica (g/100g).

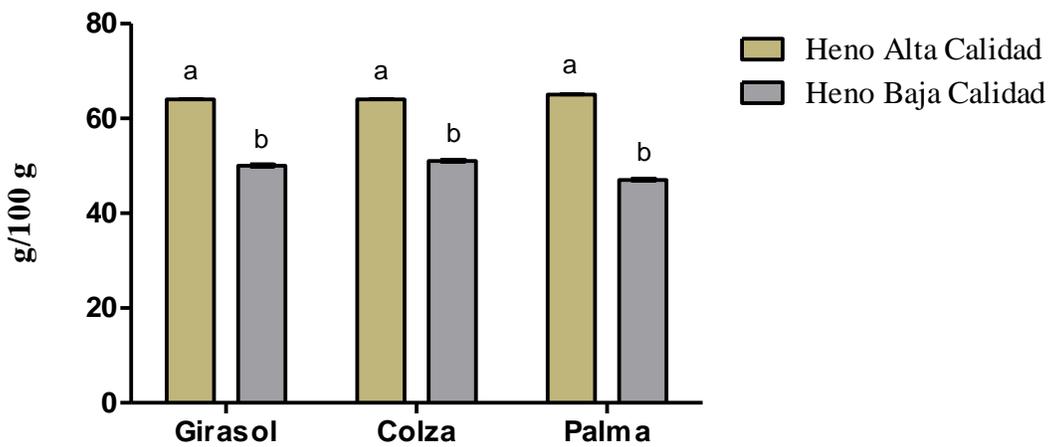


Figura 4. Efecto del tipo de grasa y la calidad del heno en las raciones experimentales sobre la digestibilidad verdadera *in vitro* de la materia orgánica (g/100g).

5.2.3 Ácidos grasos volátiles

Como puede observarse en la tabla 19, la producción de AGV totales fue mayor para el heno de alta calidad con respecto al de baja ($P=0,024$). Las diferencias en la proporción de ácidos grasos volátiles individuales solamente ocurrieron para el ácido acético. Como se observa en la figura 5 existió una interacción del nivel de grasa por el tipo de heno sobre la proporción de ácido acético, ya que no se encontraron diferencias significativas entre henos a un nivel de inclusión de grasa del 3%, pero en el nivel de inclusión de 5% de grasa en la ración se encontró una proporción más alta en un heno de baja calidad en comparación con el de alta ($P=0,039$). Del mismo modo, la interacción del nivel de grasa por la calidad del heno afectaron el ratio ácido acético:propiónico (Figura 6), sin encontrarse diferencias significativas entre tipos de heno al incluir 3% de grasa en la dieta, pero resultando en un mayor ratio al incluir heno de baja calidad en comparación con el de alta calidad ($P=0,003$) al incluir 5% de grasa en la ración.

Tabla 19. Efecto del tipo de forraje, tipo de grasa y nivel de inclusión de grasa en la ración sobre la producción *in vitro* de AGV en el fluido ruminal

	AGV totales (mmol 500 mg)	AGV (g/g AGV totales)		
		Propiónico	Butírico	Isovalérico+Isobutírico
TIPO DE GRASA				
<i>Torta de girasol</i>	4,97	0,17	0,07	1,15
<i>Torta de colza</i>	5,38	0,17	0,07	1,24
<i>Grasa de palma</i>	5,17	0,17	0,07	1,19
NIVEL DE GRASA				
3%	0,71	0,17	0,07	0,17
5%	0,70	0,17	0,07	0,16
HENO				
<i>Alta calidad</i>	5,44 ^a	0,17	0,07	1,18
<i>Baja calidad</i>	4,90 ^b	0,17	0,07	1,15
EFECTOS				
<i>Tipo</i>	0,334	0,278	0,969	0,668
<i>Nivel</i>	0,216	0,172	0,939	0,209
<i>Heno</i>	0,024	0,870	0,963	0,011
<i>Tipo*nivel</i>	ns	ns	ns	ns
<i>Tipo*heno</i>	ns	ns	ns	ns
<i>Nivel*heno</i>	ns	ns	ns	ns
<i>Tipo*nivel*heno</i>	ns	ns	ns	ns
EEM	0,525	0,003	0,007	0,022

EEM: Error estándar de la media. Valores medios dentro de una misma fila con superíndices diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$); ns: diferencias no significativas

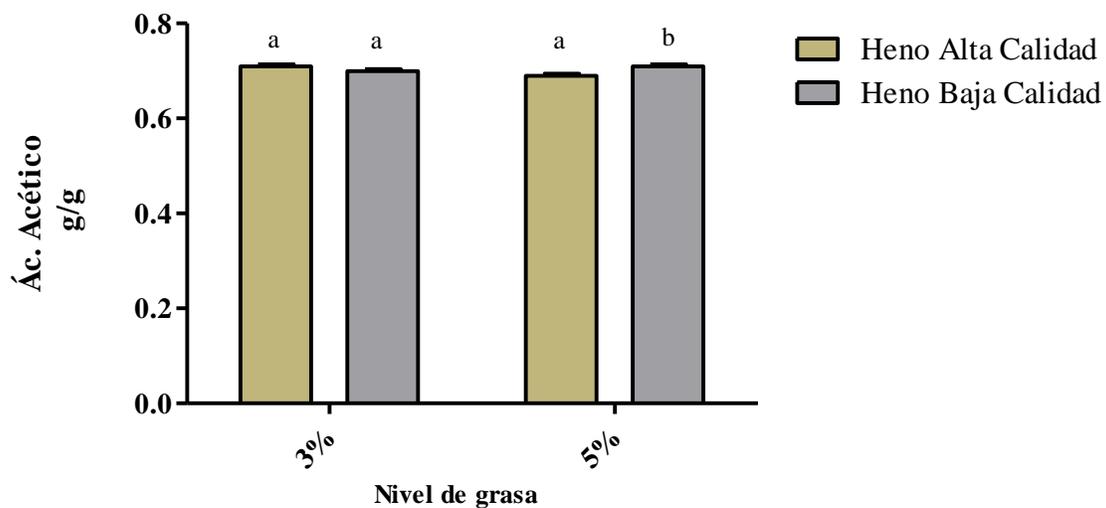


Figura 5. Efecto del nivel de grasa y la calidad del heno en las raciones experimentales sobre la producción de ácido acético (g/g del total de AGV).

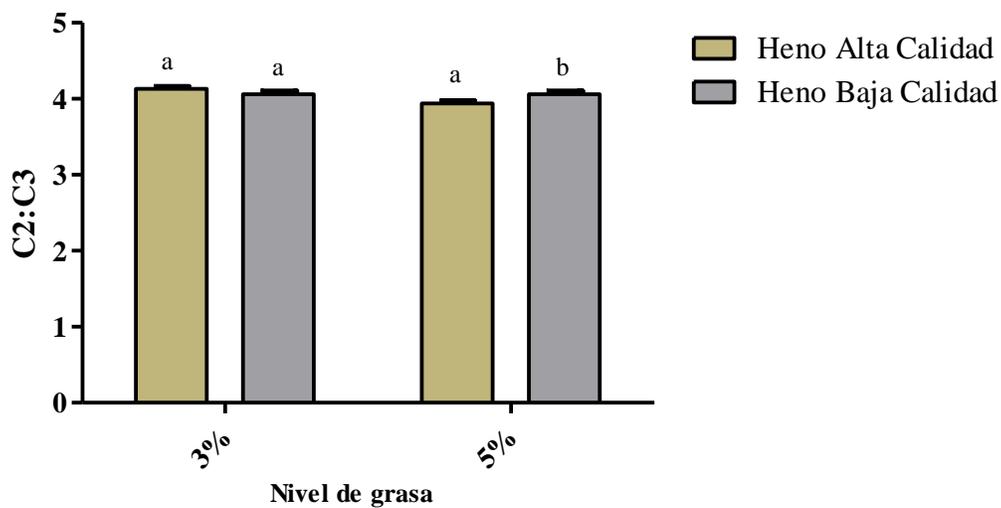


Figura 6. Efecto del nivel de grasa y la calidad del heno en las raciones experimentales sobre el ratio ácido acético:propiónico.

5.2.4. *Parámetros de síntesis microbiana y producción de metano*

Como puede apreciarse en la tabla 20, tanto FP₂₄ como SBM₂₄ fueron influenciados por el tipo de grasa empleada en las raciones experimentales, observándose que aquellas que contienen como fuente de grasa la torta de girasol presentaron valores mayores (P=0,035 para el FP₂₄ y P=0,049 para SBM₂₄) con respecto a aquellas en las que se utilizó palma. Por su parte, la calidad del heno utilizado en las incubaciones influyó tanto en el factor de partición como en la síntesis de biomasa microbiana y en la eficiencia de dicha síntesis, siendo mayor en todos los casos en los que se empleó forraje de alta calidad (P=0,001); por su parte, el ratio AGV:MOF fue menor en el heno de alta calidad (P=0,001). Como se observa en la figura 7, existió una interacción del nivel de grasa por la calidad del heno para la producción de metano por gramo de MOI, sin encontrarse diferencias entre henos al incubar un 5% de grasa en la ración, pero resultando en una menor producción de metano por gramo de MOI en el heno de alta calidad al incubar con 3% de grasa (P=0,013). La misma interacción afectó la producción de metano por gramo de MOF, sin encontrar diferencias al suplementar con 3% de grasa en la ración, resultado en una mayor producción de metano por gramo de MOF al incubar heno de baja calidad con un nivel de grasa en la ración del 5% (P=0,006) (Figura 8).

Tabla 20. Efecto del tipo de forraje, tipo de grasa y nivel de inclusión de grasa en la ración en FP₂₄ (mg MO/ml), SBM₂₄ (mg), ESM₂₄ (g/g) y AGV:SVF (mmol/g MOF) de raciones experimentales.

	FP ₂₄ ¹	SBM ₂₄ ²	ESM ₂₄ ³	AGV:MOF
TIPO DE GRASA				
<i>Torta de girasol</i>	4,03 ^a	105,56a	0,45	21,84
<i>Torta de colza</i>	3,85ab	101,28ab	0,43	23,44
<i>Grasa de palma</i>	3,78b	93,08b	0,41	23,85
NIVEL DE INCLUSIÓN				
3%	3,93	100,86	0,44	23,31
5%	3,85	99,08	0,43	22,77
HENO				
<i>Alta calidad</i>	4,06 ^a	119,74 ^a	0,46 ^a	20,94 ^a
<i>Baja calidad</i>	3,71 ^b	80,20 ^b	0,41 ^b	25,24 ^b
EFFECTOS				
<i>Tipo</i>	0,037	0,055	0,073	0,143
<i>Nivel</i>	0,272	0,648	0,532	0,519
<i>Heno</i>	,0003	<,0001	<,0001	0,002
<i>Tipo*nivel</i>	ns	ns	ns	Ns
<i>Tipo*heno</i>	ns	ns	ns	Ns
<i>Nivel*heno</i>	ns	ns	ns	Ns
<i>Tipo*nivel*heno</i>	ns	ns	ns	Ns
EEM	0,17	9,31	0,03	1,97

¹FP: Factor de partición (mg MO/ml); ²SBM: Síntesis de biomasa microbiana (g/g) ³ESM: Eficiencia de síntesis microbiana (g/g)
EEM: Error estándar de la media. Valores medios dentro de una misma fila con superíndices diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (p<0,05); ns: diferencias no significativas

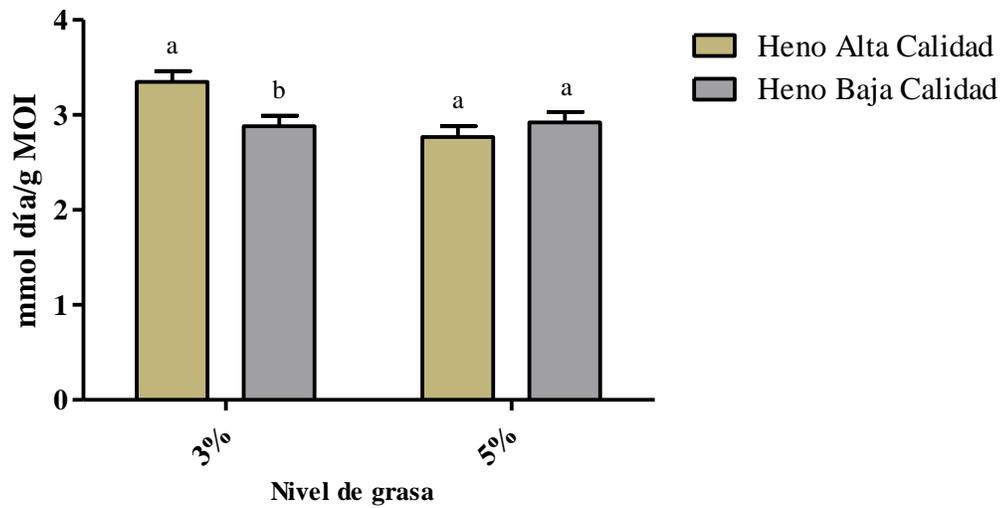


Figura 7. Efecto del nivel de grasa y la calidad del heno en las raciones experimentales sobre la producción de metano por gramo de materia orgánica incubada.

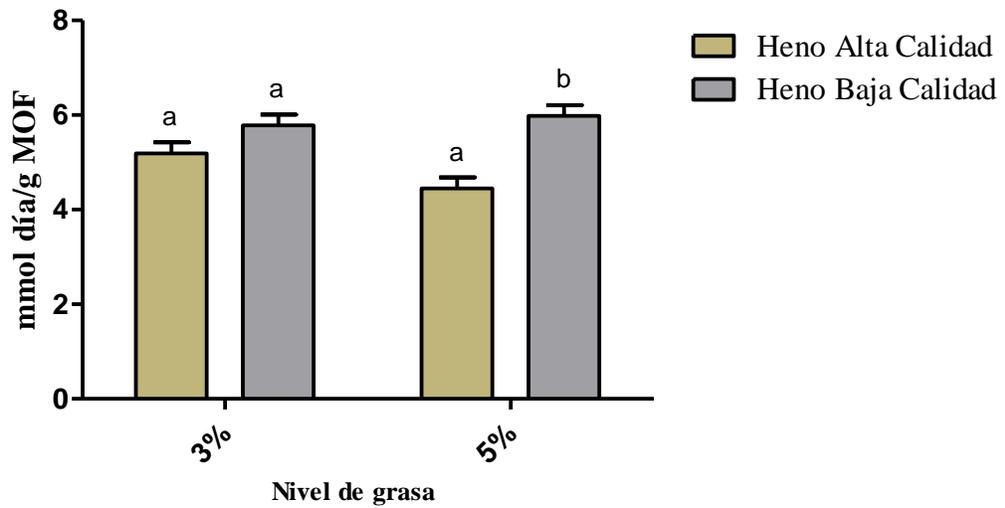


Figura 8. Efecto del nivel de grasa y la calidad del heno en las raciones experimentales sobre la producción de metano por gramo de materia orgánica fermentada.

6. DISCUSIÓN

6.1 *Caracterización de los sistemas productivos*

De acuerdo con las consideraciones de Riveiro et al. (2013) en lo que se refiere a la complejidad de los sistemas productivos animales ocasionada por el gran número de componentes que los integran, se deben tratar de especificar patrones comunes que permitan agruparlos y diferenciarlos lo mejor posible cuando se quiera realizar una categorización acertada de los mismos. El sector ovino lechero en la CAPV no es ajeno a esta situación de complejidad, pues tal y como pudo evidenciarse en los rebaños monitorizados existen características particulares que generan heterogeneidad en cada uno de ellos. La variabilidad dada por el tipo racial empleado en los rebaños fue poca, pues el 75% de los rebaños de parto y el 93% de los rebaños de inicio de lactación emplean la raza Latxa como base de su sistema productivo. Tal y como lo indicaban Ruiz et al. (1997) y Ugarte et al. (2001), la raza Latxa sigue siendo predominante en los sistemas productivos ovinos lecheros de la CAPV. Si bien durante los últimos años se ha observado una cierta introducción de razas foráneas con mayor potencial lechero como la Assaf, todavía representa un porcentaje minoritario de la cabaña de la CAPV, de apenas el 1,1% de acuerdo a los datos de las campañas sanitarias (Mediano, 2011). Esta realidad contrasta frente a su masiva presencia en otras Comunidades Autónomas (Ugarte et al., 2001; Mantecón et al., 2009; Riveiro et al., 2013). El hecho de que la muestra de los rebaños de la raza Assaf monitorizados en este proyecto, en términos de porcentaje, sea superior a la que representa esta raza en la CAPV responde al interés de profundizar en la realidad de este sistema ante el interés que pueda despertar entre técnicos y ganaderos.

La variabilidad de los rebaños aumenta al observar las características que describen el manejo alimenticio y los recursos forrajeros empleados, encontrando sistemas de producción que se corresponden con lo descrito por Baumont et al. (2000) en cuanto a la existencia de un manejo alimenticio intensivo sin pastoreo, hasta sistemas que hacen uso de pastos de valle y comunales de montaña. De igual modo pudo observarse que el manejo alimenticio difiere notablemente de acuerdo a la raza empleada, siendo intensivo sin

pastoreo para los rebaños Assaf, lo cual está de acuerdo con lo reportado por Ugarte et al. (2001), quien argumenta que los sistemas productivos de razas foráneas llevan implícitos su acondicionamiento a situaciones de producción intensiva con el suministro de raciones en estabulación permanente. Lo anterior difiere ampliamente de los sistemas tradicionales de manejo alimenticio aplicados en rebaños de Latxa, quienes están estabulados en época invernal y hacen uso de recursos pastables en zonas de monte o valle en otras épocas del año (Ugarte et al., 2001; Ruiz et al., 2002), ejerciendo también un rol ecológico importante, pues generalmente hacen uso de recursos naturales que de otra manera no podrían ser explotados, controlan el crecimiento de la vegetación y contribuyen al mantenimiento del paisaje (Baumont et al., 2000; Ugarte et al., 2001; Bernués et al., 2011).

En los rebaños de raza Latxa en los dos periodos monitorizados el uso de recursos locales prevaleció en el sentido de que los forrajes empleados (henos o henolajes de pradera, festuca y veza) son principalmente de producción propia, recurriéndose en contadas ocasiones a la compra de heno de alfalfa y paja de cereal, lo cual representa una ventaja en la medida que supone una menor dependencia externa por este concepto frente a la compra del total del alimento, reduciendo la incertidumbre que puede generar la variación de precios en el mercado, la disponibilidad del recurso por parte del proveedor, entre otros factores.

No obstante, conviene llamar la atención sobre la calidad de los forrajes empleados. Por una parte, se observa que los ganaderos tienden a reservar el forraje de mejor calidad para la lactación, cuando los animales tienen mayores necesidades nutricionales. Sin embargo, incluso en ese momento algunos de los forrajes empleados son de calidad media o incluso baja, por lo que distan mucho de ser los ideales para ese momento del ciclo productivo, siendo este un aspecto a tener muy en cuenta a la hora de establecer recomendaciones de mejora para los ganaderos de la CAPV.

Precisamente de acuerdo con Baumont et al. (2000), el uso de recursos forrajeros en los sistemas de alimentación se ha convertido en un ítem de especial importancia económica por cuanto actualmente se tiende a maximizar su proporción en la ración para minimizar los costos de producción. En relación con la cantidad de forraje suministrado en ambos

periodos con respecto a la cantidad de concentrado, existe una coherencia con lo planteado por Bocquier y González-García (2010) en relación a que los sistemas de rumiantes en general actualmente usan un 50% de forraje en la ración, y que en los países industrializados representa más del 60%, incluso en el contexto en el cual se implementan sistemas de alimentación como el unifeed.

El aporte nutricional de las raciones ofrecidas en el periodo de preparto es de especial importancia, pues es durante la gestación tardía cuando ocurre el 80% del crecimiento del feto y el aumento del contenido uterino, lo cual sumado al crecimiento del tejido mamario y formación de calostro conlleva a un incremento en el requerimiento general de nutrientes (Dawson et al., 1999; Ocak et al., 2005; Amanlou et al., 2011). Se trata además de un periodo en el que el manejo de la alimentación es crítico para evitar problemas de toxemia de gestación y para garantizar que las ovejas lleguen al parto con un nivel adecuado de reservas corporales que puedan ser movilizadas al inicio de lactación. El contenido de proteína bruta de las raciones evaluadas para este periodo se encontraron dentro de los valores recomendados por el NRC (1985), mientras que las cantidades de FND y FAD (375,8 g/kg y 242,5 g/kg, respectivamente) fueron superiores a las cantidades mínimas recomendadas por Calsamiglia et al. (2009) (300 g/kg y 200 g/kg respectivamente).

El suministro de raciones que supla en gran medida los requerimientos animales en la fase de inicio de lactación contribuye a garantizar la expresión del potencial lechero y la persistencia en la producción a lo largo de la lactación (Dawson et al., 1999). De acuerdo a lo reportado por Cannas (2004), la proteína bruta contenida en las raciones de ovejas Assaf fue superior al valor considerado como requerido (195 g/kg vs. 166 – 173 g/kg PB), mientras que en las raciones de ovejas Latxa se encontraba en torno a los valores recomendados (155 vs. 159 g/kg PB). Con respecto al contenido de FND, si bien Cannas (2004) considera que existe muy poca información relacionada con la cantidad máxima y mínima para raciones de ovino lechero, recomienda cantidades entre 332 – 389 g/kg para ovejas con producciones entre 1,5 y 2,5 kg de leche por día, valores que resultan aproximados al promedio determinado en las raciones monitorizadas (324,7 g/kg).

6.2 Incubaciones *in vitro*

Cuando un alimento es incubado con líquido ruminal tamponado, los microorganismos convierten los carbohidratos y en menor medida la proteína de los alimentos en productos finales como ácidos grasos volátiles, proteína microbiana, metano y gas carbónico (Zicarelli et al., 2011; Singh et al., 2012). De acuerdo con Singh et al. (2012) y Van Soest (1983c), el patrón de producción de gas y la velocidad a la cual el alimento incubado puede ser fermentado por unidad de tiempo depende de la composición de la ración, su calidad y disponibilidad de nutrientes, por lo cual las particularidades observadas en el manejo alimenticio, la proporción forraje/concentrado y tipo de forraje empleado pueden explicar en parte las diferencias observadas en la totalidad de los parámetros de la cinética de producción de gas al comparar las raciones de inicio de lactación con las de parto.

La reducción de un 14,34% en la producción potencial de gas (“A”), 5,53% en la cantidad de gas diaria por gramo incubado y 10,97%, por gramo fermentado en las raciones de inicio de lactación con respecto a las de parto indican diferencias tanto en los procesos de fermentación como en la degradación de las raciones ofrecidas. Si bien es cierto que trabajos como los de Zicarelli et al. (2011) y González-García et al. (2010) sustentan que al incrementar la cantidad de pienso en la ración, como es el caso de las raciones de inicio de lactación con respecto a parto, existe una mayor producción potencial de gas, una mayor disponibilidad de carbohidratos rápidamente fermentables como los aportados por el pienso favorece la síntesis microbiana (Krause et al., 2002; Cone y Becker, 2012). De igual forma, Tang et al. (2008) y Getachew et al. (2004) consideran que la técnica de producción de gas y la cuantificación del mismo a través de registros periódicos sólo tiene en cuenta el sustrato que es empleado para la producción de ácidos grasos volátiles y otros gases sin diferenciar la cantidad de sustrato que es utilizado para el crecimiento microbiano. Dijkstra et al. (2005b) argumenta que la partición del sustrato degradado entre síntesis de biomasa microbiana, ácidos grasos volátiles o gas refleja la eficiencia de dicho proceso y guardan una alta relación entre sí (Blümmel et al., 1999; Liu et al., 2009), de modo que la

combinación de mediciones de gas con la cuantificación del residuo proporcionan información complementaria relevante (Blümmel y Bullerdieck, 1997).

En el presente trabajo, los indicadores de síntesis microbiana cuantificados fueron mayores en las raciones de inicio de lactación que en las de parto, estimándose esas diferencias en un 9,40% para FP₂₄, 17,22% para SBM₂₄ y 13,33% para ESM₂₄, lo cual supone que en las dietas de lactación se observa una mayor eficiencia en el proceso de fermentación, degradación y partición del sustrato encaminado hacia la incorporación y síntesis microbiana que hacia la producción de gas. Lo anterior está de acuerdo con lo reportado por Blümmel et al. (1997), quien determinó que una baja producción de gas fue un indicativo de alta incorporación del sustrato en la biomasa microbiana tras haber cuantificado mayores valores en el factor de partición. Los AGV totales fueron un 10,21% menores en las raciones de inicio de lactación, lo cual indica una menor fermentación; del mismo modo, el cálculo del ratio AGV:MOF fue un 12,65% menor, reiterando para el último caso que el sustrato fermentado no se destinó a la producción de ácidos grasos volátiles, lo cual está de acuerdo con lo argumentado por Blümmel et al. (1997), Blümmel y Bullerdieck (1997) y Dijkstra et al. (2005b), quienes indican precisamente que existe una relación inversa entre la producción de gas y la producción de ácidos grasos volátiles y la producción de biomasa microbiana determinada *in vitro*. Además, el patrón de fermentación fue diferente en las raciones de cada estado monitorizado, encontrando que las cantidades de ácido acético, butírico e isovalérico+isobutírico fueron un 1,66%, 15,38%, 25% mayores en las raciones de lactación, así como el ratio ácido acético/ácido propiónico fue un 19,56%, mientras que la producción de ácido propiónico se redujo en un 17,39%. Aunque la mayoría de estudios indican que el tipo de fermentación de raciones en las que el componente fibroso representa una mayor cantidad favorece un aumento en la relación ácido acético/ácido propiónico y que proporciones molares de acetato y butirato son mayores, los datos obtenidos *in vitro* en este estudio se desvían de dichos argumentos. Sin embargo, de acuerdo con Getachew et al. (2004) un alto ratio ácido acético/ácido propiónico está indicando que proporcionalmente el componente fibroso de la ración es más fermentable y digestible, y si se tiene en cuenta que el aporte de pienso favorece hasta cierto punto la fermentación de la fibra, los resultados encontrados en las raciones de inicio de lactación en los cuales el ratio ácido acético/ácido

propiónico fue un 24,32% mayor y el contenido de concentrado en las raciones en general supera al de las raciones de parto, estos resultados podrían deberse a dicho efecto. De igual forma, el hecho de que las raciones de parto presenten mayores valores de ácido propiónico podrían atribuirse en cierta medida a lo reportado por Cone y Becker (2012) quienes concluyen que la incubación *in vitro* en fluido ruminal de sustratos lentamente fermentables, como sería el caso de las raciones de parto por su contenido importante de material fibroso, presenta en la parte inicial de la fermentación una fermentación más glucogénica reflejada en mayores cantidades de ácido propiónico. En relación con los ácidos grasos volátiles ramificados, Hildebrand et al. (2012) reportan que su concentración se encuentra directamente relacionada tanto con la cantidad y composición de la proteína como con su degradación. Del mismo modo, Getachew et al. (2004) afirman que el incremento en la producción de isovalerato e isobutirato puede darse cuando el contenido de proteína incrementa en la dieta. Considerando que las raciones de parto tenían un contenido medio de proteína bruta de 131,1 g/kg y las de inicio de lactación de 158,1 g/kg, el 33,30% de más en la producción de isovalerato-isobutirato en las raciones de lactación puede deberse en parte a dicha diferencia en la cantidad de proteína bruta. De manera complementaria es de referir que Liu et al. (2009) reportan que en estudios *in vitro* se ha determinado que los ácidos grasos volátiles ramificados estimulan la síntesis de proteína microbiana, lo cual está de acuerdo con los resultados encontrados en el presente estudio para los parámetros indicados.

Al comparar los valores obtenidos de digestibilidad en los dos estados fisiológicos, encontramos las raciones de inicio de lactación son un 8,6 % más digestibles que las de parto. La digestibilidad representa una medida importante para la evaluación de los alimentos para rumiantes (Zicarelli et al. 2011) y se encuentra determinada en parte por propiedades intrínsecas de cada uno de los componentes del alimento que integran la ración y por las interacciones tanto positivas como negativas que puedan darse entre los mismos (Nousiainen et al., 2009), pudiendo inferir que tal como lo argumenta Cho et al. (2012), un ingrediente de la dieta influencia la digestibilidad de otros ingredientes y de la totalidad de la ración. Del mismo modo, si se tiene en cuenta que las raciones de lactación temprana tenían un contenido superior de concentrado, los resultados obtenidos estarían de acuerdo

con lo reportado por el estudio de meta-análisis hecho por Cho et al. (2012), quienes concluyen que el incremento de concentrado en la ración favorece la digestibilidad de las raciones evaluadas.

La reducción del 14,97% para el parámetro “B” y el incremento del 39,72% de “ t_{RM} ” de las raciones de inicio de lactación podría estar relacionado con una mayor proporción de concentrado en la ración (40% en general en raciones de lactación vs. 30% en raciones de parto). De acuerdo con Hildebrand et al. (2012), el tiempo de fermentación y degradación de la materia orgánica aumenta al incrementar la proporción de concentrado en la dieta como resultado de una cantidad más alta de carbohidratos solubles, favoreciendo en gran medida la fermentación y degradación del sustrato total incubado. Del mismo modo, Zicarelli et al. (2011) y Hildebrand et al. (2012) reportaron un incremento en la tasa de producción de gas máxima al incrementar el aporte de concentrado en la ración.

Lo valores de los parámetros de la cinética de producción de gas en cada una de las raciones en el estado de parto solamente fueron diferentes para “B”, siendo un 48,59% para la ración 15 con respecto a la ración 2. Si bien es cierto que no debe dejarse de lado que el aporte nutritivo de los alimentos en la ración es aditivo y que la respuesta en términos de fermentación y degradación está relacionada con los componentes que la integran (Tang et al., 2008), la diferencia encontrada para “B” en este caso pudo deberse a la variación en el tipo de recurso forrajero empleado, pues aún con una proporción forraje/concentrado similar entre las raciones (69/31 y 68/32 para cada caso respectivamente) el rebaño 15 empleó heno de alfalfa y el rebaño 2 paja de cereal. Lo anterior está de acuerdo con lo expuesto por Singh et al. (2012) y Shibata y Terada (2010), quienes a través de la técnica de producción de gas y mediciones *in situ* determinaron que las leguminosas son más fuertemente fermentadas y degradadas en comparación a gramíneas y cereales; del mismo modo Williams et al. (1995) determinaron mediante la misma técnica que la paja de cereal presenta un mayor valor para el tiempo en el que alcanza la mitad de la producción potencial de gas cuando lo comparó con otro tipo de forrajes.

Por su parte, las diferencias en todos los parámetros de la cinética de producción de gas, en la producción de gas por día por gramo de materia orgánica incubada, AGV totales, ácido acético, AGV:MOF y metano en las raciones de inicio de lactación reflejan la amplia variabilidad en los componentes de las raciones, pues como pudo observarse en la caracterización, el componente forrajero empleado fue diverso y en todos los casos se empleó más de un tipo por ración. Es de destacar que la eficiencia del proceso de fermentación varió entre raciones, observando que la ración 1 tuvo un incremento del 59,44% en el ratio AGV:MOF con respecto a la ración 13. Del mismo modo, en términos de emisiones de metano expresado como mmol por g fermentable, el rebaño 1 produjo un 33,33% más que el rebaño 13, por lo cual puede inferirse que una ración similar a la empleada por el rebaño 13 con una proporción de forraje/concentrado 72/28 en la cual se empleó una combinación forrajera de heno de alfalfa y de pradera que resultó en un VRF de excelente y un valor de FND y FAD de 267 y 198 g/kg respectivamente, propende por emitir menos metano que la ración del rebaño 1 que empleó una proporción forraje/concentrado 50/50 conformado por heno de alfalfa y ensilaje de maíz, con un VRF de primera y un contenido en FND y FAD de 404 y 253 g/kg respectivamente. Si bien es cierto que en esta fase productiva se monitorizaron raciones que emplean forrajes con un VRF de cuarta y quinta y con valores de FND y FAD superiores a los anteriormente mencionados, los valores de metano emitido por gramo de materia orgánica fermentable no difirieron estadísticamente de los registrados como más altos o más bajos. Aunque en el presente estudio se tuvo acceso a información detallada acerca del manejo nutricional de los rebaños, en condiciones ideales sería conveniente profundizar en la caracterización de los forrajes empleados en términos de composición botánica del pasto de partida, estado vegetativo en el momento de la cosecha, entre otros, para poder hacer una mejor interpretación de los resultados obtenidos. De igual modo debe tenerse en cuenta que factores comúnmente asociados con diferencias en los procesos de metanogénesis incluyen el contenido de fibra en la ración, el contenido de carbohidratos rápidamente fermentables y la velocidad de paso de degradación del alimento (Johnson y Johnson, 1995), de los cuales desconocemos el contenido, aporte y tipo de carbohidratos rápidamente fermentables en los piensos suministrados. Por otro lado, de acuerdo con López et al. (2007), aspectos

importantes relacionados con la composición del pienso suministrado en la ración, el tipo de forraje ofrecido, su estado de madurez y edad de corte deben ser controlados y tenidos en cuenta para realizar apreciaciones concluyentes sobre resultados encontrados, pues tal y como demostró Lovett et al. (2006) la producción de metano de ciertos recursos forrajeros estimada mediante la técnica de producción de gas varía en función de la estación de crecimiento y de la calidad de los mismos. En este sentido, Mitsumori y Weibin (2008) plantea que mejorando la calidad del forraje se puede reducir la producción de metano en un rango de 20% a 40%

Como resultado de la existencia de diferencias significativas entre estados fisiológicos en términos de cinética, producción de gas y parámetros de síntesis microbiana, podría inferirse que las raciones inicio de lactación producirían menos metano por favorecer procesos de degradación encaminados a la síntesis más que a la producción de gas como tal. En este sentido los valores de producción de metano por gramo de MOI fue muy similar entre ambos estados, y por gramo de MOF fue aparentemente un 5,36% inferior en las raciones de lactación, sin embargo, dicha diferencia no fue estadísticamente significativa.

6.3. Estrategia de mitigación

Según Grainger y Beauchemin (2011) y Bocquier y González-García (2010), la suplementación de grasa en la dieta es considerada como la estrategia alimenticia más promisoría para reducir las emisiones de gases de efecto invernadero y en especial del metano en los rumiantes, pues además de existir una persistencia en dicha reducción, se ejerce un efecto nutricional favorable al representar un aporte de energía en la ración. En este estudio se propuso evaluar la inclusión de dos tortas de semillas de oleaginosas obtenidas mediante prensado en frío, que constituyen un co-producto de la industria de producción de aceite. Grainger y Beauchemin (2011) consideran que el uso en la alimentación animal de co-productos ricos en grasa provenientes de industrias agrícolas y/o alimentarias constituye un enfoque práctico a considerar para reducir las emisiones de gases de origen entérico en los sistemas productivos animales. De manera conjunta Shibata y

Terada (2010) y Eckard et al. (2010) proponen que si se tiene en cuenta que las raciones de rumiantes tienen un aporte importante de componente forrajero, también debe considerarse la mejora del estatus nutricional y la reducción de emisiones a través de la optimización en la calidad del forraje. Sin embargo, desde un punto de vista del sistema de producción en conjunto resulta relevante tener en cuenta las consideraciones de Waghorn y Clark (2006) con respecto a que un enfoque multifacético de la mitigación en general, en el que se consideren aspectos como el análisis del ciclo de vida para integrar todas las entradas y salidas del sistema productivo identificará mejores oportunidades para desarrollar y aplicar.

Partiendo de lo planteado por Blümmel et al. (1997), quien hace referencia a que la producción de gas se encuentra estrechamente relacionada con la fermentación del sustrato incubado, y considerando que la cuantificación del mismo no diferencia la cantidad de sustrato que es utilizado para el crecimiento microbiano conviene interpretar de manera conjunta los parámetros que describen los dos comportamientos. En este estudio los parámetros de la cinética de producción de gas se encontraron afectados por la calidad del heno incubado y por el tipo de grasa incubado. Para el heno de alta calidad la producción potencial de gas fue 19,62% menor, mientras que la tasa máxima de producción de gas y el tiempo en el que se alcanza dicha tasa máxima fueron 53,84% y 19,52% mayores con respecto al de baja calidad. Para las raciones incubadas con torta de girasol se presentó una reducción del 10,46% en el tiempo en el que se alcanza la mitad del valor potencial de gas. En términos de los parámetros que indican síntesis microbiana, en las raciones incubadas con heno de alta calidad se presentó un aumento del FP_{24} , SBM_{24} y ESM_{24} , de un 9,43%, 49,30% y 12,20% , mientras que el ratio AGV:MOF fue 20,53% menor para dicho tipo de heno. Por su parte la inclusión de torta de girasol como fuente de grasa en la ración favoreció en un 6,61% el FP_{24} y un 13,40% la SBM_{24} en con respecto a la grasa de palma. Teniendo en cuenta que la partición del sustrato fermentado entre producción de gas y síntesis de biomasa microbiana refleja la eficiencia del proceso fermentativo (Dijkstra et al. (2005b), se considera que las raciones incubadas con heno de alta calidad son más eficientes en dicho proceso en relación con las incubadas con heno de baja calidad. Por su parte Blümmel et al. (2003) consideran que en nutrición de rumiantes es preferible una alta eficiencia de síntesis microbiana en lugar de altas tasas de producción de ácidos grasos

volátiles, pues conlleva a un eficaz uso del nitrógeno y carbono disminuyendo su flujo hacia la emisión de desechos y gases. En relación al efecto favorable de incubar con heno de alta calidad, los resultados están de acuerdo a lo planteado por Mitsumori y Weibin (2008), quienes argumentan que una síntesis de biomasa microbiana adecuada difícilmente se logra con el uso de forrajes de baja calidad. Con respecto al efecto del tipo de grasa en la ración, Ivan et al. (2001) afirman que el contenido de ácidos grasos insaturados de cadena larga en la dieta ejercen un efecto tóxico sobre los protozoos, que si se tiene en cuenta que dentro de las diversas funciones de estos microorganismos está la de consumir y digerir bacterias ruminales (Dayani et al., 2007), puede inferirse que al reducir su número se reduce su efecto deletéreo sobre la población bacteriana. En términos prácticos, una alta conversión del alimento degradado a biomasa microbiana disminuye la necesidad de suplementar en la ración fuentes de proteína indegradable en el rumen (Blümmel et al., 2003)), lo cual se suma como otro argumento favorable a considerar al elegir tanto el componente forrajero de la ración como otro tipo materias primas que se quieran incluir.

La producción de metano es un proceso intrínseco de la fermentación ruminal. Sin embargo, el enfoque actual se centra en reducir las emisiones de metano por unidad de alimento digerido, aunque debe tenerse en cuenta que el interés final es mitigar las emisiones del sistema productivo entero como un reto (Bodas et al., 2012). Teniendo en cuenta que no todos los componentes de la ración se fermentan de la misma manera en el rumen, la producción de metano varía de acuerdo a la composición de la ración y al tipo de fermentación que se favorezca. Así, Dijkstra et al. (2005a) y Mitsumori y Weibin (2008) afirman que dentro de los factores que afectan dicha producción se encuentran la calidad del alimento, la eficiencia de crecimiento microbiano y el tipo de ácidos grasos producidos, siendo el ácido acético aquel que ejerce una mayor influencia. En el presente estudio, la incubación de raciones con 5% de grasa y heno de baja calidad ocasionaron un incremento del 16,62% en la producción de gas por gramo de materia orgánica fermentada, de 2,8% en la cantidad de ácido acético, de 3% en el ratio ácido acético:propiónico lo cual indica que se está favoreciendo una fermentación acética que a su vez se reflejó en un incremento del 34,4% de la producción de metano por gramo de MOF. Considerando que el contenido en FND del heno de baja calidad empleado en este estudio fue superior en relación al de alta

calidad (613,3 vs. 467,3), y teniendo en cuenta que forrajes de baja calidad con mayor contenido de fibra incrementa la cantidad de metano producido por favorecer el aumento en la cantidad de ácido acético en relación al propiónico (Johnson y Johnson, 1995; Mitsumori y Weibin, 2008), los resultados obtenidos resultan coherentes. Por su parte, en relación al efecto ejercido por el nivel de grasa, Martin et al. (2010) y Bodas et al. (2012) consideran que la respuesta al suministro de lípidos en la producción de metano depende en gran parte del tipo de dieta, de la proporción forraje/concentrado y de las características propias de cada componente, incluso del tipo de ácidos grasos que constituyan el aporte de lípido suministrado. En todo caso, el modo de acción de las mismas es mediante la reducción de la metanogénesis a través de la inhibición de los protozoos, el incremento en producción de ácido propiónico y la biohidrogenación de ácidos grasos insaturados (Loor et al., 2004). Aunque el efecto benéfico de la grasa sobre las emisiones de metano se encuentra suficientemente argumentado, la cantidad más conveniente de la misma depende de la calidad del heno que conforme la ración, pues en este caso se logró una reducción en la emisión de metano por gramo de materia orgánica fermentable al incubar un 5% de grasa en la ración total con un heno de alta calidad en comparación con uno de baja.

7. CONCLUSIONES

- ✓ Los rebaños ovinos lecheros de la CAPV que fueron monitorizados en el presente trabajo durante las etapas de parto e inicio de lactación, presentaron una amplia variabilidad en el tipo y calidad de los recursos forrajeros empleados, la proporción forraje/concentrado y el aporte nutricional de las raciones, con valores promedios en el contenido de proteína bruta y fibras en la ración que proporcionan la cantidad indicada como requerida por los animales en cada etapa productiva.
- ✓ Aunque los ganaderos tienden a reservar los forrajes de más alta calidad para el inicio de lactación, a menudo la calidad de estos es todavía ampliamente mejorable. De igual modo
- ✓ Los parámetros de fermentación ruminal estimados *in vitro* varían entre las raciones suministradas en los dos estados fisiológicos, siendo mayores los valores de la producción potencial de gas, el ratio AGV:MOF y AGV'S en las raciones de parto con respecto a las de inicio de lactación. Aunque no se encontraron diferencias en la emisión de metano por gramo de MOI ni MOF entre estados, los valores de digestibilidad de la materia orgánica y los parámetros de síntesis de biomasa microbiana (FP₂₄,SBM₂₄, ESM₂₄) fueron mayores en las raciones de inicio de lactación, indicando una mayor eficiencia en el proceso de degradación, fermentación y partición del sustrato encaminado hacia la incorporación y síntesis microbiana que hacia la producción de gas.
- ✓ Las estrategias de mitigación de emisiones de metano planteadas en el presente trabajo han puesto de manifiesto el efecto favorable de la utilización de forrajes de mayor calidad frente a los de baja calidad, así como la introducción de alimentos que aumentan el contenido de grasa en la ración, pues se genera una reducción de metano en términos de emisión por gramo de MOF al incubar un heno de alta calidad y un nivel de grasa en la ración del 5%.

- ✓ Si bien el tipo de grasa empleada no ejerció un efecto significativo en la mitigación de la emisión de gas ni de metano, se observó un efecto favorable de la torta de girasol frente a la grasa de palma en los parámetros evaluados que indican síntesis microbiana, pudiéndose inferir que su uso sería favorable en raciones de lactación, en el que los animales requieren mayores cantidades de proteína indegradable en el rumen.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abberton, M.T., Macduff, J.H., Marshall, A.H., Humphreys, M.W., 2008. The genetic improvement of forage grasses and legumes to enhance adaptation of grasslands to climate change., United National Climate Change Conference, FAO, Nusa Dua, Bali, Indonesia, pp. 3-14.

Aguilar-Pérez, C.F., Ku-Vera, J.C., Magaña-Monforte, J.G., 2011. Energetic efficiency of milk synthesis in dual-purpose cows grazing tropical pastures. *Tropical Animal Health Production* 43, 767-772.

Amanlou, H., Karimi, A., Mahjoubi, E., Milis, C., 2011. Effects of supplementation with digestible undegradable protein in late pregnancy on ewe colostrums production and lamb output to weaning. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 95, 616-622.

Atasoglu, C., Wallace, R.J., 2003. Metabolism and *de novo* synthesis of amino acids by rumen microbes, In: D'Mello, J.P.F. (Ed.), *Aminoacids in Animal nutrition*, CABI, London, UK.

Bach, A., Calsamiglia, S., Stern, M.D., 2004. Nitrogen metabolism in the rumen. *Journal of Dairy Science* 88, 9-21.

Bannink, A., Tamminga, S., 2005a. Rumen Function, In: Dijkstra, J., Forbes, J.M., France, J. (Eds.), *Quantitative Aspects of Ruminant Digestion and Metabolism*, CAB International, Cambridge UK, pp. 263-288.

Bannink, A., Tamminga, S., 2005b. Rumen Funtion, In: Dijkstra, J., Forbes, J.M., France, J. (Eds.), *Quantitative Aspects of Ruminant Digestion and Metabolism*, CABI, Cambridge, pp. 263 - 290.

Baumont, R., Prache, S., Meuret, M., Morand-Fehr, P., 2000. How forage characteristics influence behaviour and intake in small ruminants: a review. *Livestock Production Science* 64, 15-28.

Bell, M.J., Eckard, R.J., 2012. Reducing Enteric Methane Losses from Ruminant Livestock – Its Measurement, Prediction and the Influence of Diet, In: Javed, K. (Ed.), *Livestock Production*, Croatia.

Bernués, A., Ruiz, R., Olaizola, A., Villalba, D., Casasús, I., 2011. Sustainability of pasture-based livestock farming systems in the European Mediterranean context: Synergies and trade offs. *Livestock Science* 139, 44 - 57.

Bhatta, R., Tajima, K., Tukurari, K., Higuchi, K., Enishi, O., Kurihara, M., 2007. Comparison of *In vivo* and *In vitro* techniques for methane production from ruminant diets. *Asian-Aust J Anim Sci* 20, 1049 - 1056.

Blümmel, M., Aiple, K.P., Steingäß, H., Becker, K., 1999. A note on the stoichiometrical relationship of short chain fatty acid production and gas formation in vitro in feedstuffs of widely differing quality. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 81, 157-167.

Blümmel, M., Bullerdieck, P., 1997. The need to complement in vitro gas production measurements with residue determinations from in sacco degradabilities to improve the prediction of voluntary intake of hays. *Animal Science* 64, 71-75.

Blümmel, M., Givens, D.I., Moss, A.R., 2005. Comparison of methane produced by straw fed sheep in open-circuit respiration with methane predicted by fermentation characteristics measured by an in vitro gas procedure. *Animal Feed Science and Technology* 123–124, Part 1, 379-390.

Blümmel, M., Karsli, A., Russell, R., 2003. Influence of diet on growth yields of rumen micro-organisms *in vitro* and *in vivo*: influence on growth yield of variable carbon fluxes to fermentation products. *British Journal of Nutrition* 90, 625-634.

Blümmel, M., Lebzien, P., 2001. Predicting ruminal microbial efficiencies of dairy rations by *in vitro* techniques. *Livestock Production Science* 68, 107-117.

Blümmel, M., Steingäß, H., Becker, K., 1997. The relationship between *in vitro* gas production, *in vitro* microbial biomass yield and N incorporation and its implications for the prediction of voluntary feed intake of roughages. *British Journal of Nutrition* 77, 911-921.

Bocquier, F., González-García, E., 2010. Sustainability of ruminant agriculture in the new context: feeding strategies and features of animal adaptability into the necessary holistic approach. *Animal* 4, 1258-1273.

Bodas, R., Prieto, N., García-González, R., Andrés, S., Giráldez, F.J., López, S., 2012. Manipulation of rumen fermentation and methane production with plant secondary metabolites. *Animal Feed Science and Technology* 176, 78-93.

Calabrò, S., López, S., Piccolo, V., Dijkstra, J., Dhanoa, M.S., France, J., 2005. Comparative analysis of gas production profiles obtained with buffalo and sheep ruminal fluid as the source of inoculum. *Animal Feed Science and Technology* 123–124, Part 1, 51-65.

Calsamiglia, S., 1997. Nuevas bases para la utilización de la fibra en dietas de rumiantes, XIII Curso de Especialización FEDNA, FEDNA, Madrid.

Calsamiglia, S., Bach, A., de Blas, C., Fernández, C., García-Rebolar, P., 2009. Necesidades nutricionales para rumiantes de leche. Normas FEDNA.

Cannas, A., 2004. Feeding of lactating ewes, In: Pulina, G., Bencini, R. (Ed.), *Diary Sheep Nutrition*, CABI Publishing, p. 79.

Cone, J.W., Becker, P.M., 2012. Fermentation kinetics and production of volatile fatty acids and microbial protein by starchy feedstuffs. *Animal Feed Science and Technology* 172, 34-41.

Cone, J.W., van Gelder, A.H., 1999. Influence of protein fermentation on gas production profiles. *Animal Feed Science and Technology* 76, 251-264.

Chenost, M., Aufrère, J., Machebœuf, D., 2001. The gas-test technique as a tool for predicting the energetic value of forage plants. *Anim. Res.* 50, 349-364.

Cho, A.S., Ueda, K., Kondo, S., 2012. Evaluation of associative effects on ruminal digestion kinetics between pasture and grains using in vitro gas production method. *Animal Science Journal* 83, 650-655.

Dawson, L.E.R., Carson, A.F., Kilpatrick, D.J., 1999. The effect of the digestible undegradable protein concentration of concentrates and protein source offered to ewes in late pregnancy on colostrum production and lamb performance. *Animal Feed Science and Technology* 82, 21-36.

Dayani, O., Ghorbani, G.R., Rahmani, H.R., Mir, P.S., 2007. Effects of dietary whole cottonseed and crude protein level on rumen protozoal population and fermentation parameters. *Small Ruminant Research* 69, 36-45.

Dijkstra, J., Forbes, J.M., France, J., 2005a. *Quantitative Aspects of Ruminant Digestion and Metabolism*. CABI, Cambridge.

Dijkstra, J., Kebreab, E., Bannink, A., France, J., López, S., 2005b. Application of the gas production technique to feed evaluation systems for ruminants. *Animal Feed Science and Technology* 123–124, Part 1, 561-578.

Eckard, R.J., Grainger, C., de Klein, C.A.M., 2010. Options for the abatement of methane and nitrous oxide from ruminant production: A review. *Livestock Science* 130, 47-56.

FAOSTAT, 2013. FAO, Roma.

France, J., Dijkstra, J., 2005. Volatile fatty acid production, In: Dijkstra, J., Forbes, J.M., France, J. (Eds.), *Quantitative Aspects of Ruminant Digestion and Metabolism*, CABI, Cambridge, pp. 157 - 176.

France, J., Dijkstra, J., Dhanoa, M.S., Lopez, S., Bannink, A., 2000. Estimating the extent of degradation of ruminant feeds from a description or their gas production profiles observed *in vitro*: derivation of models and other mathematical considerations. *British Journal of Nutrition* 83, 143-150.

Frutos, P., Hervás, G., Ramos, G., Giráldez, F.J., Mantecón, A.R., 2002. Condensed tannin content of several shrub species from a mountain area in northern Spain, and its relationship to various indicators of nutritive value. *Animal Feed Science and Technology* 95, 215-226.

Gabiña, D., Santamaría, P., Ugarte, E., 2000. The definition of breeding objectives in the Latxa dairy sheep breed, In: Gabiña, D. (Ed.), *Analysis and definition of the objectives in genetic improvement programmes in sheep and goats. An economic approach to increase their profitability*, CIHEAM - Options Méditerranéennes, Zaragoza, pp. 19-25.

Gabiña, D., Ugarte, E., 2001. Milking and milk production of dairy sheep in Spain. *Arch. Tierz., Dummerstorf* 44, 315-321.

Getachew, G., DePeters, E.J., Robinson, P.H., Fadel, J.G., 2005a. Use of an in vitro rumen gas production technique to evaluate microbial fermentation of ruminant feeds and its impact on fermentation products. *Animal Feed Science and Technology* 123–124, Part 1, 547-559.

Getachew, G., Robinson, P.H., DePeters, E.J., Taylor, S.J., 2004. Relationships between chemical composition, dry matter degradation and in vitro gas production of several ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology* 111, 57-71.

Getachew, G., Robinson, P.H., DePeters, E.J., Taylor, S.J., Gisi, D.D., Higginbotham, G.E., Riordan, T.J., 2005b. Methane production from commercial dairy rations estimated using an in vitro gas technique. *Animal Feed Science and Technology* 123-124, 391-402.

González-García, E., Albanell, E., Caja, G., Casals, R., 2010. In vitro fermentative characteristics of ruminant diets supplemented with fibrolytic enzymes and ranges of optimal endo- β -1,4-glucanase activity. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 94, 250-263.

Grainger, C., Beauchemin, K.A., 2011. Can enteric methane emissions from ruminants be lowered without lowering their production? *Animal Feed Science and Technology* 166, 308-320.

Groot, J.C.J., Cone, J.W., Williams, B.A., Debersaques, F.M.A., Lantinga, E.A., 1996. Multiphasic analysis of gas production kinetics for in vitro fermentation of ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology* 64, 77-89.

Grossblatt, N., 2001a. Fat, In: Grossblatt, N. (Ed.), *Nutrient Requirements of Dairy Cattle: Seventh Revised Edition*, National Academy Press, Washington, D.C.

Grossblatt, N., 2001b. Protein and Amino Acids, In: Grossblatt, N. (Ed.), Nutrient Requirements of Dairy Cattle: Seventh Revised Edition, National Academy Press, Washington, D.C, pp. 43 - 85.

Hildebrand, B., Boguhn, J., Dänicke, S., Rodehutschord, M., 2012. Effect of Fusarium toxin-contaminated triticale and forage-to-concentrate ratio on fermentation and microbial protein synthesis in the rumen. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 96, 307-318.

Hook, S.E., Wright, A., G., -D., McBride, B.W., 2010. Methanogens: Methane Producers of the Rumen and Mitigation Strategies. *Archaea* 2010.

Ivan, M., Mir, P.S., Koenig, K.M., Rode, L.M., Neill, L., Entz, T., Mir, Z., 2001. Effects of dietary sunflower seed oil on rumen protozoa population and tissue concentration of conjugated linoleic acid in sheep. *Small Ruminant Research* 41, 215-227.

Jenkins, T.C., 1993. Lipid Metabolism in the Rumen. *Journal of dairy science* 76, 3851-3863.

Jeranyama, P., García, A., 2004. Understanding relative feed value (RFV) and relative forage value (RFQ), Cooperative Extension Service, College of Agriculture & Biological Sciences/South Dakota State University / USDA, pp. 1-3.

Johnson, K.A., Johnson, D.E., 1995. Methane emissions from cattle. *Journal of Animal Science* 73, 2483 - 2492.

Jouany, J.P., 1982. *Science des Aliments* 2.

Krause, K.M., Combs, D.K., Beauchemin, K.A., 2002. Effects of Forage Particle Size and Grain Fermentability in Midlactation Cows. I. Milk Production and Diet Digestibility. *Journal of dairy science* 85, 1936-1946.

Lascano, C.E., Cárdenas, E.A., 2010. Alternatives for methane emission mitigation in livestock systems. *Revista Brasileira de Zootecnia* 39, 175-182.

Legaz, E., Álvarez, I., Royo, L.J., Fernández, I., Gutiérrez, J.P., Goyache, F., 2008. Genetic relationships between Spanish Assaf (Assaf.E) and Spanish native dairy sheep breeds. *Small Ruminant Research* 80, 39-44.

Liu, Q., Wang, C., Huang, Y.X., Dong, K.H., Yang, W.Z., Zhang, S.L., Wang, H., 2009. Effects of isovalerate on ruminal fermentation, urinary excretion of purine derivatives and digestibility in steers. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 93, 716-725.

Loor, J.J., Ueda, K., Ferlay, A., Chilliard, Y., Doreau, M., 2004. Biohydrogenation, duodenal flow, and intestinal digestibility of trans fatty acids and conjugated linoleic acids in response to dietary forage:concentrate ratio and linseed oil in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 87, 2472-2485.

López, S., 2005. *In vitro* and *In situ* techniques for estimating digestibility, Quantitative Aspects of Ruminant Digestion and Metabolism, CABI, Cambridge, p. 746.

López, S., Dhanoa, M.S., Dijkstra, J., Bannink, A., Kebreab, E., France, J., 2007. Some methodological and analytical considerations regarding application of the gas production technique. *Animal Feed Science and Technology* 135, 139-156.

Lovett, D.K., McGilloway, D., Bortolozzo, A., Hawkins, M., Callan, J., Flynn, B., O'Mara, F.P., 2006. In vitro fermentation patterns and methane production as influenced by cultivar and season of harvest of *Lolium perenne* L. *Grass and Forage Science* 61, 9-21.

Makkar, H.P.S., 2005. In vitro gas methods for evaluation of feeds containing phytochemicals. *Animal Feed Science and Technology* 123–124, Part 1, 291-302.

Mantecón, A.R., Villadangos, B., Martínez, Y., Lavín, P., 2009. Dairy sheep production systems in central-north Spain: Effect of flock size. *Options Méditerranéennes: Changes in sheep and goat farming systems at the beginning of the 21st century*.

MARM, 2011a. Caracterización del sector ovino y caprino en España año 2011, In: Ministerio de agricultura, a.y.m.a. (Ed.), pp. 1-22.

MARM, 2011b. Encuesta Nacional de Ganado Ovino-Caprino, Informe noviembre de 2011 <http://publicacionesoficiales.boe.es/>, In: Ministerio de Agricultura, A.y.M.A. (Ed.), Gobierno de España, pp. 1-10.

Martin, C., Morgavi, D.P., Doreau, M., 2010. Methane mitigation in ruminants: from microbe to the farm scale. *Animal* 4, 351-365.

Martínez, S., Franco, I., Carballo, J., 2011. Spanish goat and sheep milk cheeses. *Small Ruminant Research* 101, 41-54.

Mauricio, R.M., Mould, F.L., Dhanoa, M.S., Owen, E., Channa, K.S., Theodorou, M.K., 1999. A semi-automated in vitro gas production technique for ruminant feedstuff evaluation. *Animal Feed Science and Technology* 79, 321-330.

McDougall, E.I., 1948. Studies on ruminant saliva. 1. The composition and output of sheep's saliva. *Biochem. J.* 43, 99 - 109.

Mediano, L., 2011. Análisis del sector del cordero lechal de oveja Latxa en la comunidad autónoma de Euskadi (C.A.E.): Diagnóstico de la situación y estrategias de actuación.

Mirzaei-Aghsaghali, A., Maheri-Sis, N., 2011. Factors affecting mitigation of methane emission from ruminants I: Feeding Strategies. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances* 6, 888-908.

Mitsumori, M., Weibin, S., 2008. Control of rumen microbial fermentation for mitigating methane emissions from the rumen. *Asian-Aust J Anim Sci* 21, 144 - 154.

Navarro-Villa, A., O'Brien, M., López, S., Boland, T.M., O' Kiely, P., 2011. Modifications of a gas production technique for assessing *in vitro* rumen methane production from feedstuffs. *Animal Feed Science and Technology* 166-167, 163-174.

Nousiainen, J., Rinne, M., Huhtanen, P., 2009. A meta-analysis of feed digestion in dairy cows. 1. The effects of forage and concentrate factors on total diet digestibility. *Journal of dairy science* 92, 5019-5030.

NRC, 1985. *Nutrient Requirements of sheep*. Subcommittee on sheep nutrition, Washington, D.C.

Ocak, N., Cam, M.A., Kuran, M., 2005. The effect of high dietary protein levels during late gestation on colostrum yield and lamb survival rate in singleton-bearing ewes. *Small Ruminant Research* 56, 89-94.

Pell, A.N., Schofield, P., 1993. Computerized Monitoring of Gas Production to Measure Forage Digestion In Vitro. *Journal of dairy science* 76, 1063-1073.

Ramírez-Restrepo, C.A., Barry, T.N., 2005. Alternative temperate forages containing secondary compounds for improving sustainable productivity in grazing ruminants. *Animal Feed Science and Technology* 120, 179-201.

Riveiro, J.A., Mantecón, A.R., Álvarez, C.J., Lavín, P., 2013. A typological characterization of dairy Assaf breed sheep farms at NW of Spain based on structural factor. *Agricultural Systems* 120, 27-37.

Ruiz, R., Díez Unquera, B., Beltran de Heredia, I., Arranz, J., Mandaluniz, N., Ugarte, E., 2011. Is cheese making and marketing by farmers determining sustainability in dairy sheep? *Options Méditerranéennes: Serie A. Séminaires Méditerranéens* 231-239.

Ruiz, R., Oregui, L.M., Bravo, M.V., Urarte, E., 1997. A dairy ewe sustainable livestock system in the basque country. Characteristics and constraints, *Livestock systems in European rural development*, Nafplio, Greece.

Ruiz, R., Oregui, L.M., Elgarresta, M., Marijuan, S., 2002. Environmental and economic aspects of the dairy sheep system in the Basque Country. *Options Méditerranéennes: Serie B. Etudes et Recherches* 39, 39-45.

Rymer, C., Huntington, J.A., Williams, B.A., Givens, D.I., 2005. In vitro cumulative gas production techniques: History, methodological considerations and challenges. *Animal Feed Science and Technology* 123–124, Part 1, 9-30.

Shibata, M., Terada, F., 2010. Factors affecting methane production and mitigation in ruminants. *Animal Science Journal* 81, 2-10.

Singh, S., Kushwaha, B.P., Nag, S.K., Mishra, A.K., Singh, A., Anele, U.Y., 2012. In vitro ruminal fermentation, protein and carbohydrate fractionation, methane production and prediction of twelve commonly used Indian green forages. *Animal Feed Science and Technology* 178, 2-11.

Tang, S.X., Tayo, G.O., Tan, Z.L., Sun, Z.H., Wang, M., Ren, G.P., Han, X.F., 2008. Use of In vitro Gas Production Technique to Investigate Interactions between rice straw, wheat straw, maize stover and alfalfa or clover. *Asian-Aust J Anim Sci* 21, 1278-1285.

Theodorou, M.K., Williams, B.A., Dhanoa, M.S., McAllan, A.B., France, J., 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology* 74, 185-197.

Tolera, A., Said, A.N., 1997. In sacco, in vitro and in vivo digestibility and supplementary value of some tropical forage legume hays to sheep feeding on a basal diet of maize stover. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 77, 35-43.

Ugarte, E., Arranz, J., Ugarte, E., Arrese, F., Oregui, L.M., Bravo, M.V., Ruiz, R., 1999. Organization of development structures in dairy latxa (breed) sheep in the autonomous community of the Spanish Basque Country, In: R, R., Morand-Fehr, P. (Eds.), *Systems of sheep and goat production: Organization of husbandry and role of extension services*, CIHEAM Zaragoza, pp. 255-262.

Ugarte, E., Ruiz, R., Gabiña, D., Beltran de Heredia, I., 2001. Impact of high-yielding foreign breeds on the Spanish dairy sheep industry. *Livestock Production Science* 71, 3-10.

Van der Poel, A.F.B., Prestløkken, E., Goelema, J.O., 2005. Feed Processing: Effects on Nutrient Degradation and Digestibility, In: Dijkstra, J., Forbes, J.M., France, J. (Eds.), *Quantitative Aspects of Ruminant Digestion and Metabolism*, CAB International, Cambridge UK, pp. 627 - 661.

Van Soest, P., 1983a. *Intermediary metabolism, Nutritional ecology of the ruminant*, O & B Books, Covallis, Oregon., pp. 249 - 260.

Van Soest, P., 1983b. Rumen anatomy and function, O & B Books, Corvallis, Oregon, pp. 178 - 194.

Van Soest, P.J., 1983c. The kinetics of digestion, O & B Books, Covallis, Oregon., pp. 211-230.

Van Soest, P.J., 1983d. Lipids, Nutritional ecology of the ruminant, O & B Books, Corvallis, Oregon., pp. 260-275.

Waghorn, G.C., Clark, D.A., 2006. Greenhouse gas mitigation opportunities with immediate application to pastoral grazing for ruminants. International Congress Series 1293, 107-110.

Williams, B., Bhatia, S., Boer, H., Tamminga, S., 1995. A preliminary study using the cumulative gas production technique to compare the kinetics of different fermentations by use of standard substrates. Ann. Zootech. 44, 35.

Williams, B.A., 2000. Cumulative gas-production techniques for forage evaluation, In: Givens, D.I. (Ed.), Forage Evaluation in Ruminant Nutrition, CABI, New York, pp. 189-213.

Wolin, M.J., 1960. A Theoretical Rumen Fermentation Balance. Journal of dairy science 43, 1452-1459.

Wood, C.D., Manyuchi, B., 1997. Use of an in vitro gas production method to investigate interactions between veld hay and Napier hay or groundnut hay supplements. Animal Feed Science and Technology 67, 265-278.

Wright, A., Klieve, A., 2011. Does the complexity of the rumen microbial ecology preclude methane mitigation? Animal Feed Science and Technology 166-167, 248 - 253.

Zicarelli, F., Calabrò, S., Cutrignelli, M.I., Infascelli, F., Tudisco, R., Bovera, F., Piccolo, V., 2011. In vitro fermentation characteristics of diets with different forage/concentrate ratios: comparison of rumen and faecal inocula. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 91, 1213-1221.