



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE ENSEÑANZA, INVESTIGACIÓN

Y SERVICIO EN ZOOTECNIA

POSGRADO EN PRODUCCIÓN ANIMAL

ÍNDICES DE CONTAMINACIÓN ATMOSFÉRICA Y PRODUCTIVIDAD DE VACAS JERSEY Y SUS CRUZAS CON HOLSTEIN EN PASTOREO

TESIS

Que como requisito parcial

para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS EN INNOVACIÓN GANADERA

Presenta:

LUISA MARÍA ELVIRA CÁCERES OCAMPOS

Bajo la supervisión de: JOSÉ GUADALUPE GARCÍA MUÑIZ, Ph.D



Diciembre de 2015

Chapingo, México



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE ENSEÑANZA, INVESTIGACIÓN

Y SERVICIO EN ZOOTECNIA

POSGRADO EN PRODUCCIÓN ANIMAL

**ÍNDICES DE CONTAMINACIÓN ATMOSFÉRICA Y PRODUCTIVIDAD DE
VACAS JERSEY Y SUS CRUZAS CON HOLSTEIN EN PASTOREO**

TESIS

Que como requisito parcial

para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS EN INNOVACIÓN GANADERA

Presenta:

LUISA MARÍA ELVIRA CÁCERES OCAMPOS

Bajo la supervisión de: **JOSÉ GUADALUPE GARCÍA MUÑOZ PhD**



DIRECCIÓN GENERAL ACADÉMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXAMENES PROFESIONALES



Diciembre de 2015

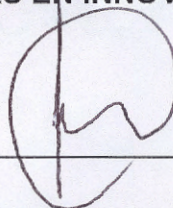
Chapingo, México

ÍNDICES DE CONTAMINACIÓN ATMOSFÉRICA Y PRODUCTIVIDAD DE VACAS JÉRSEY Y SUS CRUZAS CON HOLSTEIN EN PASTOREO

Tesis realizada por **LUISA MARÍA ELVIRA CÁCERES OCAMPOS** bajo la dirección del Ph.D. José Guadalupe García Muñiz y supervisión del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN INNOVACIÓN GANADERA

DIRECTOR: _____



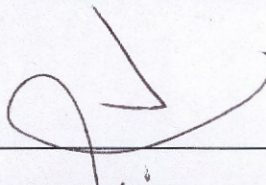
Ph.D. JOSÉ GUADALUPE GARCÍA MUÑIZ

ASESOR: _____



Dr. ALEJANDRO LARA BUENO

ASESOR: _____



Dr. LUIS ALBERTO MIRANDA ROMERO

CONTENIDO

LISTA DE CUADROS.....	v
LISTA DE FIGURAS.....	vi
AGRADECIMIENTOS.....	vii
DEDICATORIA	viii
DATOS BIOGRÁFICOS.....	ix
1 INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
1.1 Objetivo general.....	2
1.2 Objetivos específicos	2
1.3 Hipótesis de investigación.....	2
2 REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1 Técnica de producción de gas (TPG) y digestibilidad <i>in vitro</i> de la materia seca (DIVMS).....	3
2.2 Factores que afectan la producción de gas ..	4
2.2.1 Sustrato y pH ruminal.....	4
2.2.2 Periodo de adaptación	7
2.2.3 Tampones e inóculo ruminal ..	7
2.2.4 Especie donadora.....	9
2.3 Modelación de los perfiles de producción de gas	10
2.4 Emisión de gases de efecto invernadero (GEI) por el ganado y su contribución al calentamiento global y al cambio climático. Críticas y controversia.....	12
2.5 Emisiones de GEI globales y en Latinoamérica.....	16
2.6 Inventarios nacionales y estimación de emisiones ganaderas de GEI en México.....	16
2.7 Mitigación de las emisiones de GEI en pastoreo	20
2.8 Reducción de las emisiones de GEI y productividad	18
2.9 Literatura citada	28
3. Resumen general-Overall summary	39
3.1 <i>IN VITRO</i> GREENHOUSE EMISSIONS, INDEX OF ATMOSPHERIC POLLUTION AND PRODUCTIVITY FROM JERSEY DAIRY COWS AND THEIR CROSSES IN MIXED AND OAT PASTURE	41
3.1.1 Resumen.....	41
3.1.2 Abstract.....	42
3.1.3 Introduction	43
3.1.4 Materials and methods.....	44
3.1.4.1 Location	44
3.1.4.2 Experimental units.....	44
3.1.4.3 <i>In vitro</i> incubation, digestibility and GHG emissions.....	45

3.1.4.4 Calculating of the digestible dry matter (DDM), absolute indexes of atmospheric pollutions (IAPs) and linkage with the productivity.....	46
3.1.5 Statistical analysis.....	47
3.1.6 Result and discussion	48
3.1.7 Conclusions	57
3.1.8 References.....	58
3.2 HIGHER <i>IN VITRO</i> DIGESTIBILITY USING RUMEN LIQUOR OF LACTATING JERSEY COMPARED TO HOLSTEIN X JERSEY CROSSBRED COWS GRAZING	61
3.2.1 Resumen.....	61
3.2.2 Abstract.....	62
3.2.3 Introduction	63
3.2.4 Materials and methods.....	64
3.2.4.1 Sampling scheme, botanical composition and laboratory analyses	64
3.2.4.2 Management animal and ruminal inoculum.....	67
3.2.4.3 IVDMD analysis of pasture samples	68
3.2.5 Statistical analysis.....	68
3.2.6 Result and discussion	69
3.2.6.1 Solution to random effects	69
3.2.6.2 Solution to fixed effects	70
3.2.7 Conclusions	76
3.2.8 References.....	77

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Estimativo de las principales fuentes naturales y antropogénicas de CH ₄ a nivel global.....	15
Cuadro 2. Emisiones mundiales totales y aporte de GEI de la agricultura	16
Cuadro 3. Ingesta promedio de materia seca y emisión de CH ₄ simuladas para vacas en regiones cálidas y templadas de México.	18
Cuadro 4. Indicadores de la emisión de CH ₄ reportados por distintas técnicas	27
Table 5. Experimental units characterization	48
Table 6. Least square means of milk production traits by pasture and genotype (standard error of the different)	49
Table 7. Estimation of daily digested dry matter (DDMD, kg) and indexes of atmospheric pollution (IAPs) (liters per day ⁻¹) according to pasture, herbage mass type (Pre-Post-g) and genotype (standard error of the different).....	52
Table 8. Estimated variance components for the random effects of index air pollutions (IAPs) related to milk production (MP), protein (PROT) and FAT using rumen liquor of JY or HY cows.....	53
Table 9. Levels of significance (probability) for the type 3 tests of the fixed effects fitted to the models of index air pollutions for CH ₄ (CH ₄) related to milk production (MP), protein (PROT) and FAT of JY or HJ cows.....	54
Table 10. Levels of significance (probability) for the type 3 tests of the fixed effects fitted to the models of index air pollutions for CO ₂ (CO ₂) related to milk production (MP), protein (PROT) and FAT of JY or HJ cows.....	54
Table 11. Levels of significance (probability) for the type 3 tests of the fixed effects fitted to the models of index air pollutions total (IAPT) related to milk production (MP), protein (PROT) and FAT of JY or HJ cows.....	55
Table 12. Least square means (±SE) for the significant fixed in the models of GHG emission and index air pollutions (IAP) of pasture samples digested by ruminal liquor of JY or HJ cows.....	56
Table 13. Botanical composition of forage samples.....	65
Table 14. Estimated variance components for the random effects fitted to the model to analyze the experimental data comparing the effect of JY and HJ crossbred cows rumen liquor on the IVDMD from pre-grazing and post-grazing herbage mass samples of an organic dairy pasture.....	70
Table 15. Level of significance (probability) for the type 3 tests of the fixed effects fitted to the model to analyze the effect of rumen liquor of JY and HJ crossbred cows on the IVDMD of pre-grazing and post-grazing herbage mass samples of an organic dairy pasture.	71
Table 16. Least square means (±SE) for the significant fixed in the IVDMD (%) model of pasture samples digested by rumen liquor of purebred JY or HY crossbred cows from an organic dairy pasture.....	74

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Evolución de las emisiones de GEI por sector en México	17
Figure 2. Proximate analysis and gross energy per herbage mass type (PR=pre-grazing, PO=post-grazing) and days of sampling (D1 to D3 in mixed pasture and D4 to D6 in oat pasture).....	66
Figure 3. Average values of NDF, ADF, NFE (%) and NFE: NDF ratio obtained by samples pasture: mixed (M), oat (O) and total forage (F) according to herbage mass type (PR=pre-grazing and PO= post-grazing)	66
Figure 4. Interaction significant between days of sampling by genotype fitted in the model for IVDMD (%) using rumen liquor of JY and HJ crossbred cows from organic dairy pasture	72

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Producción Animal (PPA) de la Universidad Autónoma Chapingo (UACH), por habernos albergado durante este proceso de formación.

Al Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA) y el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) de México, por la beca de estudio brindada en pos del fomento de capacidades humanas en países de Latinoamérica y el Caribe.

A los Dres. José Guadalupe García Muñiz, Alejandro Lara Bueno y Luis Alberto Miranda Romero, Director y miembros respectivos de Comité, por su contribución para el desarrollo del presente trabajo.

A miembros del laboratorio de Microbiología Pecuaria, Forrajes y Nutrición Animal del Departamento de Zootecnia de la UACH, por su colaboración para el procesamiento de muestras y fase de fermentación *in vitro*.

DEDICATORIA

Al Ser Supremo, dador de vida y fuente de la que emana sapiencia y todo bien.

A las personas que nos impulsan a cultivar y edificarnos, especialmente a mis padres Héctor y Luisa, paradigmas de que con tesón y entereza pueden los sueños convertirse en bellas realidades.

A los docentes de la institución, por transitar con nosotros esta senda sinuosa pero al fin proficua del aprendizaje y el saber.

A los compañeros y amigos de siempre.

DATOS BIOGRÁFICOS



Datos generales

Nombre: Luisa María Elvira Cáceres Ocampos

Fecha de Nacimiento: 17 de febrero de 1988

Lugar de Nacimiento: Caacupé, Departamento de la Cordillera, Paraguay

CURP: CAOL880217MNECCS02

Profesión: Médico Veterinario

Registro Profesional: 2672

Desarrollo académico

Bachillerato: Colegio Técnico en Salud Carmen Casco de Lara Castro, Departamento Central, Paraguay

Licenciatura: Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de Asunción, Sede Central, Paraguay

Maestría: Innovación Ganadera, Universidad Autónoma Chapingo, Chapingo, México

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

Los rumiantes domésticos proveen 70% de la proteína de origen animal consumida en el mundo (Minson, 2012) con mínima competencia por los insumos de la alimentación humana. En contraparte, la actividad ganadera emite anualmente 80 megatoneladas (Mt) de metano (CH_4) o 1.85 millones de gigagramos (Gg) equivalentes de CO_2 (eCO_2), siendo responsable de hasta 40% de las emisiones antropogénicas de CH_4 y 80% de las emisiones agrícolas globales (FAOSTAT, 2012; GLEAM-FAO, 2014). Ante tal coyuntura y perspectivas exponenciales de expansión de la población mundial, la ganadería afronta actualmente el desafío de intensificar su producción, reduciendo eficientemente sus emisiones por unidad de producto o superficie.

El pastoreo constituye una de las estrategias productivas más costo-eficientes, pudiendo contribuir además como excelentes sumideros de carbono (C) a mitigar las emisiones de gases de efecto invernadero (GEI) evidenciado por estudios comparativos de adopción parcial o total de prácticas como la mejora de pasturas (principalmente mediante el empleo de praderas mixtas) y cambios en el uso de la tierra, con proyecciones de reducción sostenida del 7% de las emisiones agrícolas al año 2030 bajo estos sistemas (Thornton y Herrero, 2010).

La selección de especies forrajeras como las leguminosas por su parte, ofrecen mayor potencial de mitigación (Andrade-Rivero *et al.*, 2012) al igual que la selección de biotipos animales eficientes, dadas las variaciones individuales e interraciales cuantificables por diversos métodos (Johnson *et al.*, 1995; Storm *et al.*, 2012; Cersosimo y Wright, 2015). Por lo antes expuesto, el objetivo de la presente investigación es estimar los índices de contaminación atmosférica y la productividad de las vacas Jersey y sus cruza con Holstein en praderas mixtas y monófitas de avena.

1.1 Objetivo general

Evaluar el efecto del tipo de pradera, masa de forraje y genotipo sobre los índices de contaminación atmosférica total, específicos por metano y dióxido de carbono en función a la productividad de las vacas Jersey y cruza con Holstein, pastoreando forraje ofrecido y residual en pradera mixta y monófito de avena de un módulo de producción orgánica de leche.

1.2 Objetivos específicos

Estimar las emisiones *in vitro* de GEI de los dos genotipos de vacas lecheras en pastoreo mediante el volumen total (VT24) y residual de gas (VR24) producido en incubaciones de forraje a 24 horas.

Valorar la productividad de cada genotipo en términos de rendimiento de diario (Kg) y composición de la leche: principalmente grasa y proteínas (%).

Calcular los índices de contaminación atmosférica total (ICAT) y específicos por metano y dióxido de carbono (ICA_{CH_4} , ICA_{CO_2}) a partir del volumen total (VT24) y residual de gas (VR24) producido en incubaciones de forraje a 24 horas y su relación con la productividad de ambos genotipos de vacas lecheras.

Determinar la digestibilidad *in vitro* de muestras de forraje a 24 horas incubado separadamente líquido ruminal por animal y genotipo.

1.3 Hipótesis de investigación

El genotipo lechero, forraje pre- y post-pastoreado de pradera mixta y monófito de avena difieren e interaccionan entre sí presentando diferentes emisiones *in vitro* de GEI e índices de contaminación atmosférica y productividad.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Técnica de producción de gas (TPG) y digestibilidad *in vitro* de la materia seca (DIVMS)

La fermentación *in vitro* permite determinar la extensión y cinética de degradación del alimento a través del volumen de gas producido durante el proceso fermentativo (Theodorou *et al.*, 1994). Al igual que otras técnicas de bioensayo emplea sustrato molido, medio anaeróbico, temperatura de 39°C e inóculo ruminal (Williams, 2000), midiéndose el volumen de gas a presión atmosférica constante o la presión de gas a volumen fijo por metodologías manuales, semiautomáticas y automáticas.

Simulaciones *in vitro* son habitualmente efectivas por su bajo costo de operación, independencia de animales canulados y adecuada correlación con técnicas *in vivo* e *in situ* (Tagliapietra *et al.*, 2012; Stalker *et al.*, 2014; Dixon and Coates, 2015), permitiendo la comparación de sustratos e inóculos bajo factores específicos que en condiciones *in vivo* pueden no ser completamente controlados (Kajikawa *et al.*, 2003, Navarro-Villa *et al.*, 2011).

El gas producido por incubación del sustrato proviene directamente de la fermentación acética y butírica e indirectamente del fluido ruminal neutralizado a partir de la fermentación propiónica (Schofield *et al.*, 1994). Los carbohidratos como la celulosa y el almidón constituyen los principales sustratos y fuentes de ácidos grasos volátiles (AGV) en el rumen, ya que la producción de gas derivada de los lípidos y la fermentación proteica es escasa (Makkar, 2001).

Respecto a la adecuación de la TPG para estimación de las emisiones de gases de efecto invernadero (GEI), estudios comparando la producción *in vitro* de metano (CH₄) con reportes por la técnica del SF₆ (hexafluoruro de azufre) y cámaras respiratorias han presentado buena (Bhatta *et al.*, 2006 y 2008) y mala concordancia (Patra y Saxena, 2010; Klevenhusen *et al.*, 2011). Informes inter-laboratoriales de producción asintótica de gas muestran coeficiente de variación

(CV) de 1.8 a 7.6% entre duplicados, siendo por tanto igual o superior la variación esperada para la producción *in vitro* de CH₄, con un nivel extra-analítico implicado (Cornou *et al.*, 2012).

2.2 Factores que afectan la producción de gas

Entre los factores que afectan la producción de gas se pueden mencionar el tipo de sustrato e inóculo, la especie donadora de fluido ruminal, la adaptación al alimento, el pH del medio y el tampón empleado (Pell *et al.*, 1997).

2.2.1 Sustrato y pH ruminal

Por sus características bromatológicas, tasa de pasaje y/o presencia de metabolitos secundarios el tipo de sustrato o forraje influye sobre la actividad celulolítica y el rendimiento animal. Menores valores de pH ruminal, concentraciones superiores de AGV e inferior relación acetato: propionato se evidencian en animales con alta proporción de granos en la dieta, mientras que la fermentación de las paredes celulares resulta en mayor proporción acetato: propionato. Sin embargo, también se ha observado mayor impacto *per se* del sustrato que del pH sobre los productos finales de fermentación (Rusell, 1998).

A su vez, influyen sobre la cinética de fermentación y emisión de GEI características físico-químicas del alimento, por ejemplo la temperatura y el proceso de secado del sustrato que generalmente se realiza por congelación o en horno a bajas temperaturas (60 o 70°C) y la molienda que favorece la degradación microbiana, utilizándose en la mayoría de los casos una criba de 1 a 2 mm de diámetro (Rosero, 2002).

La madurez del forraje o uso de ensilado respecto a heno o forraje seco, también afecta la magnitud de fermentación y producción de GEI, en virtud a la menor digestibilidad (Benchaar *et al.*, 2001), por lo que tratamientos como la amoniatización o empleo de álcalis con forrajes de baja calidad provoca mayores emisiones conforme al mejoramiento de la digestibilidad; sin embargo,

la pérdida global o por unidad de producto disminuiría (Johnson y Johnson, 1995).

Las correlaciones entre carbohidratos no-estructurales (CNE) y contenido de fibra respecto a la digestibilidad o capacidad fermentativa del sustrato son bien conocidas (Coblentz *et al.*, 2013), pero partiendo de las ideas de Blaxter y Clapperton (1965) el paradigma de que los alimentos fibrosos son presumiblemente menos digestibles debe ser revolucionado, proponiéndose la relación entre los CNE y la fibra detergente neutro (FDN): CNE/FDN, como mejor indicador de la calidad del forraje que valores de FDN y FDA (fibra detergente ácido), clásicamente asociados con disminución de la ingesta voluntaria y digestibilidad de la materia seca (MS) respectivamente.

Noguera *et al.* (2006) evaluando los efectos de la adición de papa (*Solanum tuberosum*) a la cinética de fermentación *in vitro* de pasto Kikuyo (*Pennisetum clandestinum*) concluyeron que los volúmenes finales de gas, la tasa y el tiempo de colonización fueron mejorados conforme los niveles de adición de papa se incrementaron (0-60%). El incremento de la producción de CH₄ como resultado del incremento de la digestibilidad de la MS y el nivel de CNE en la ración también fue reportado (Chai *et al.*, 2004; Posada-Ochoa *et al.*, 2014), mientras que en forrajes tropicales caracterizados por limitados CNE la producción de este gas está positivamente correlacionado con el contenido de fibra, requiriéndose entonces conocer la digestibilidad verdadera de esta porción (Belete y Hassen, 2014).

Hadadd y Grant (2000) evaluando diferentes relaciones de CNE: FDN, establecieron rango de 0.7 a 1.2 para maximizar la digestibilidad de la fibra del forraje, mediado por efecto directo sobre el pH ruminal o la prestación eficiente de energía para la actividad microbiana del rumen, de principal importancia para sistemas de producción basados en pastoreo en los que el consumo de energía ha sido identificado como el factor más limitante para el rendimiento de los animales (O'Mara, 2000).

El aumento de la relación CNE: FDN por incremento del nivel de carbohidratos fermentables también puede tener efecto adverso sobre el pH y la digestibilidad ruminal, conclusión a la que arribaron Hadadd y Grand tras adición de 30, 35 y 40% de almidón de maíz en base seca (BS) a dietas con base en ensilado de maíz o alfalfa suministrados a animales con diferentes valores de pH ruminal (5.8 vs.6.8), demostrando la importancia del concepto tamponizante de la dieta o FDN físicamente efectiva (FDNfe) para esta relación.

Beckman y Weiss (2005) señalaron que debido a la sensibilidad de las bacterias, tanto fibrolíticas como metanogénicas a la disminución del pH ruminal, a mayor inclusión de almidón en la dieta la digestión de la FDN se reduce; siendo en general muy variables las concentraciones de este nutrimento en los alimentos, citándose de 45 a 72% en la avena y el maíz a menos del 15% en la alfalfa y forrajes perennes en base seca (BS) (Grant, 2005).

Weimer (1998) investigando la vía acetilclástica postularon a la metanogénesis como sumidero o vía aceptora de hidrogeniones (H_2), que en oposición al concepto tradicional de ineficiencia de la producción de CH_4 para el rumiante, en caso omiso paradójicamente podría afectar el pH del medio y la degradación de la materia orgánica en el rumen. Esta estrecha relación entre las especies H_2 -transferentes como *Prevotella spp* y las *archeas* para aprovechar la ingesta y absorber energía, fue evidenciada incluso en humanos por el más abundante aislamiento de éstos microorganismos en el intestino grueso de personas obesas respecto a las de peso normal (Zhang *et al.*, 2007).

La cantidad de sustrato requerido para evaluar la cinética de fermentación varía entre 0.1 a 1 g (Williams, 2000), ya que con aumento de la cantidad de muestra disminuye la producción de gas por gramo de MS debido al agotamiento del tampón o a la baja proporción de microorganismos en relación al sustrato (Getachew *et al.*, 1998).

2.2.2 Periodo de adaptación

Kajikawa *et al.* (2003) sugieren período de adaptación de siete días con dietas de buena calidad y de entre cuatro a once días cuando se evalúan dietas de baja calidad en rumiantes. Sin embargo, Williams *et al.* (2009) han indicado que los metanógenos pueden requerir más de cuatro semanas para adaptación a los cambios de la dieta, rebasando el periodo de aclimatación de dos semanas propuesto para las bacterias ruminales.

Debido a exigentes requerimientos, de los 28 géneros y 111 especies clasificadas, los microorganismos metanogénicos no son consistentemente aislados recurriéndose mayormente a técnicas moleculares y filogenéticas como la hibridación rRNA 16S fluorescente para su clasificación (Hook *et al.*, 2010; Chattopadhyay y Widjaja, 2014).

Otro método innovador para detección de la abundancia metanogénica se basa en la presencia de un biomarcador lipídico llamado *archaeol* que puede ser cuantificado en las heces por cromatografía de gases acoplado a espectrómetro de masas (CG-MS), presentando buena correlación con técnicas moleculares como la PCR cuantitativa (PCRc) (McCartney *et al.*, 2014).

La población metanogénica está asociada al consumo de alimento residual (CAR) y la eficiencia alimenticia del individuo (EA) (Carberry *et al.*, 2014) suscitando incluso interés de investigación metagenómica por interacción del hospedero con el microbioma ruminal (Weimer *et al.*, 1999; Guan *et al.*, 2008; Benson *et al.*, 2010; Denman y McSweeney, 2015).

2.2.3 Tampones e inóculo ruminal

Todos los medios emplean tampón de bicarbonato (HCO_3^-) y fosfato (PO_4^{3-}), un agente reductor, una fuente de nitrógeno (N), minerales y resazurina como indicador del potencial redox. Si bien los datos de producción de gas serían más fácilmente interpretados con un sistema tampón basado únicamente en

HCO_3^- o PO_4^{3-} , para lograr un $\text{pH} > 6$ la mezcla de ambos buffers es necesaria (Pell y Schofield, 1993).

En todos los casos, el dióxido de carbono (CO_2) es usado durante la preparación del medio para asegurar un bajo potencial redox al momento de la inoculación, ya que la ausencia de anaerobiosis resulta en pérdida de bacterias amilolíticas y celulolíticas (Williams, 2000), prolongando el tiempo de colonización y la digestión de FDN. No obstante, se debe tener presente que en medio acuoso el CO_2 tiende a formar soluciones hipersaturadas, lo cual se evita con suave agitación periódica para no alterar las presiones o volúmenes de gas obtenidos (Schofield, 2000).

Como regla general, se recomienda colectar el inóculo de dos a tres animales antes de la alimentación, puesto que el fluido ruminal tomado en ayunas es menos activo pero de actividad más consistente que el colectado tras la alimentación, en relación a la abrupta actividad microbiana y picos de producción de AGV, CO_2 y CH_4 entre las 2 a 4 horas post-prandiales y la inhibición o reducción del microbioma por variaciones del pH ruminal durante los intervalos de alimentación (Shabi *et al.*, 1999, Kinsman *et al.*, 2005, Zhang *et al.*, 2007).

El uso de gases trazadores con conocida tasa de liberación como el SF_6 se basa en que junto al CH_4 ambos son liberados desde el rumen, pudiendo ser muestreados con igual probabilidad en cada ciclo respiratorio o de eructación. Sin embargo, debido a los picos y fluctuaciones diurnas en la emisión de GEI tras la digestión ruminal, es recomendable el muestreo sobre un ciclo completo de alimentación (usualmente 24 horas) para evitar el sesgo (Lassey *et al.*, 2011), contrariamente a la alta relación lineal ($r=0.88$) entre emisión de CH_4 durante el ordeño y emisiones diarias detectadas en cámaras respiratorias por Garnsworthy *et al.* (2012), sugiriendo ser ya un periodo eficiente de monitoreo.

El procedimiento de licuado del fluido ruminal favorece la fermentación ya que separa e incrementa en el inóculo el número de bacterias, en su mayoría

fibrolíticas, adheridas a la fibra (Pell y Schofield 1993), pero también acrecienta el riesgo de exposición al oxígeno (O_2) si el flujo de CO_2 no es suficientemente fuerte (Williams, 2000).

Respecto al inóculo, estudios *in vitro* describen que un medio con 20 a 25% de fluido ruminal proporciona mejores resultados (Schofield, 2000). Sin embargo, la proporción líquido ruminal-tampón ha variado ampliamente de 1:2 (Cone *et al.*, 1996; Menke y Steingass, 1998) a 1:4 (Pell y Schofield, 1993) y 1:9 (Theodorou *et al.*, 1994; Mauricio *et al.*, 1999).

La inclusión de frascos blancos (cuyas producciones de gas suelen representar 13 a 27% de las lecturas finales) con inóculo pero sin sustrato es ampliamente recomendada para conocer la fermentación real; además, ya que un mismo sustrato puede exhibir distinto patrón de fermentación en jornadas sucesivas, se recomienda la inclusión de estándares de conocida producción de gas por replicación para evaluar el líquido ruminal y considerar factores de corrección de entre el 90 a 110% de los volúmenes de gas promedio de las corridas (Schofield, 2000).

2.2.4 Especie donadora

Diferencias en la actividad de los microorganismos ruminales de diferentes especies o aún de la misma especie pero con dietas diferentes demuestran la importancia de que la TPG se describa y replique bajo condiciones del animal donador (Williams, 2000).

Blaxter y Clapperton (1965) no encontraron diferencias significativas en la cantidad de CH_4 emitido por bovinos y ovinos a nivel de mantenimiento, sin embargo, los distintos valores de emisión de CH_4 utilizados en los inventarios atribuyen diferencias a distintas poblaciones microbianas entre esas especie (Williams, 2000). Así, los factores de emisión (FE) para fermentación entérica ($Kg\ CH_4\ cabeza\ año^{-1}$) considerados por especie animal en México son los

siguientes: bovinos carne (47.41), bovinos leche (104.35), ovinos y caprinos (5), porcinos (1), equinos (18) (INECC, 2008).

Debido a la complejidad del ecosistema ruminal, para estimaciones de la producción de CH_4 no se ha recomendado el empleo de heces como fuente de inóculo (Mould *et al.*, 2005) proponiéndose extracción alternativa de líquido ruminal por sondaje esofágico o a partir de animales enteros sacrificados ante la falta de animales canulados.

2.3 Modelación de los perfiles de producción de gas

Muchos modelos no lineales han sido propuestos para la parametrización de los perfiles de degradación (Beuvink y Kogut, 1993). Cada modelo presenta ventajas y desventajas dependiendo de las condiciones experimentales y el tipo de sustrato (Noguera *et al.*, 2005), lo que hace necesario seleccionar el modelo matemático más adecuado, considerando no sólo el ajuste estadístico, sino principalmente el significado biológico de los parámetros (Williams, 2000).

Por el limitado número de datos, al utilizar jeringas de vidrio o sistemas manométricos, los perfiles de producción de gas pueden ser descritos por simples modelos exponenciales que, basados en cinéticas de primer orden asumen tasa constante de fermentación (Cone *et al.*, 1997). Sin embargo, equipos más avanzados como los transductores de presión cuantifican la cinética de fermentación con alta precisión, posibilitando el empleo de modelos multifásicos para fracciones más rápida y lentamente fermentables (Groot *et al.*, 1996; Noguera *et al.*, 2005).

Modelos trifásicos para carbohidratos solubles, insolubles (que necesitan ser hidratados y colonizados) y por último, para el gas por reciclaje de la población microbiana más que por fermentación del alimento han sido descritos (Van Milgen *et al.*, 1991; Cone *et al.*, 1997). Para soslayar esta última fase es aconsejable evitar fermentaciones prolongadas tras el agotamiento del sustrato,

porque la lisis microbiana dificulta la interpretación de los datos (Stefanon *et al.*, 1996).

La fibra natural al ser una mezcla de componentes, es digerida a diferentes tasas, desde cultivos puros de celulosa con cinética de primer orden a la diversidad química y morfológica de los forrajes que dificulta la descripción matemática de su degradación (Schofield *et al.*, 1994).

Los modelos exponenciales no sigmoidales fueron los primeros en ser propuestos por Ørskov *et al.* (1979) para describir *in situ* la cinética de degradación de concentrados proteicos en bolsas de nylon. Sin embargo, desde entonces la mayoría de los autores han coincidido en afirmar que los modelos exponenciales sigmoidales presentan mejor ajuste a curvas de fermentación *in vitro*, permitiendo diferenciar tres fases de acuerdo a la velocidad de proliferación de la población microbiana: lag o inicial, exponencial y asintótica, siendo actualmente los modelos multi-fásicos y combinaciones logístico-exponenciales los enfoques más prometedores (Wang *et al.*, 2011).

La TPG puede ser empleada en modelos nutricionales como el Cornell Net Carbohydrates and Protein System (CNCPS) (Russell *et al.*, 1992), que clasifica los carbohidratos en cuatro fracciones y curvas de sustracción: (A) azúcares y ácidos orgánicos, (B1) almidones y sustancias pécticas, (B2) fibra digestible y (C) residuo indigestible.

La relación entre sustrato verdaderamente degradado (mg) y volumen de gas producido (ml) que disminuye con el tiempo de incubación, refleja variaciones en la producción de AGV (proporción molar) y biomasa microbiana (10 a 32 mg) por unidad de ATP (López *et al.*, 1998), originando el concepto de “factor de partición” que sugiere realizar mediciones simultáneas del gas y el residuo degradado a determinados intervalos. Así, sustratos con alta degradabilidad y factor de partición respecto a la producción de gas poseen mayor eficiencia en la síntesis de proteína microbiana y menor producción de CH₄ (Makkar, 2001).

A lo largo del tiempo, adecuadas correlaciones entre producción *in vitro* de gas han sido reportadas: con la digestibilidad de la materia orgánica (MO) (Menke *et al.*, 1988), con consumo de forraje, siendo la degradabilidad ruminal incluso superior a la del tracto digestivo total (Ørskov *et al.*, 1988), con el contenido de almidón en granos de cereal (Opatpatanakit *et al.*, 1994), con la desaparición de FDN (Pell *et al.*, 1996) y MS (López *et al.*, 1998).

Además de determinar la digestibilidad, la TPG denota la importancia de las diferentes fracciones (monosacáridos, pectinas, almidón, celulosa y hemicelulosa) para proveer energía a los microorganismos ruminales (Nsahlai *et al.*, 1995). No obstante, una de las probables razones por la que la digestibilidad *in vitro* presenta menores valores que la *in situ* o *in vivo*, es la acumulación de factores antinutricionales que alcanzan niveles inhibitorios para los microorganismos durante la fermentación (Williams, 2000).

La TPG tiene potencial para investigar interacción de fracciones solubles e insolubles y efectos asociativos entre alimentos, principalmente en etapas tempranas de fermentación (Liu *et al.*, 2002), incubando las dietas por separado y en combinación.

2.4 Emisión de gases de efecto invernadero (GEI) por el ganado y su contribución al calentamiento global y al cambio climático. Críticas y controversias.

En el año 2006, en su publicación titulada “La larga sombra del ganado”, la FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura) proporcionó estimaciones de CO₂, óxido nitroso (NO₂) y CH₄ emitidos por el sector ganadero, señalando que, por su fisiología digestiva, los rumiantes son responsables de hasta el 18% de las emisiones globales de GEI, superando incluso al sector transportes (Steinfeld *et al.*, 2006).

Otra de las críticas es que los productos pecuarios llevan una gran huella ecológica (eCO₂, equivalentes de CO₂) en comparación con otros alimentos

(Hermansen y Kristensen, 2011). Como ejemplo, el sector lechero genera a lo largo de su cadena productiva del 2.7 al 4% del total de las emisiones ganaderas, con una huella ecológica de $2.4 \text{ kg eCO}_2 \cdot \text{kg producto}^{-1}$ (FAO, 2010). Sin embargo, existen controversias actuales sobre estas cifras basadas en todo el ciclo de vida del ganado y su procesamiento, no habiéndose realizado consideraciones similares para el análisis de otros sectores como el transporte (Pitesky *et al.*, 2011).

Al absorber radiación infrarroja, la vibración de los GEI libera calor a ser sucesivamente absorbido por otra molécula que los rodea, conociéndose como efecto invernadero a este proceso natural o exacerbado de mantener calor en la superficie de la Tierra. Hasta el Protocolo de Montreal (1987) se ha atribuido la destrucción de la capa de ozono (O_3) al incremento de la concentración de los CFC (clorofluorocarbonados) contenidos en aerosoles y equipos de refrigeración (Primavesi *et al.*, 2004); panorama cambiado en el Protocolo de Kioto como parte de la Convención Marco de las Naciones Unidas sobre el Cambio Climático (CMNUCC, 1997), tras estimación de GEI provenientes de la industria, agricultura y quema de combustibles fósiles.

El potencial de calentamiento global (*GWP por sus siglas en inglés*) de un GEI representa su impacto sobre el clima en el tiempo, expresado como masa eCO_2 a 100 años, mientras que el forzamiento climático o radiativo se relaciona con las concentraciones atmosféricas de un GEI (en p.p.m. o p.p.t.) y su capacidad de absorción de energía infrarroja por superficie. Así desde la era industrial al 2009 el forzamiento radiativo directo en vatios por m^2 ($\text{W} \cdot \text{m}^{-2}$) fue de 1.0 para GEI distintos al CO_2 , de los cuales 0.5 se debió al CH_4 y 0.001 al SF_6 y otros gases. De lo anterior se desprende que la reducción de gases de vida corta como el CH_4 es una de las estrategias más eficientes de mitigación de GEI a corto plazo, ante proyecciones de forzamiento radiativo de hasta $1.5 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$ para el 2050 (Montzka *et al.*, 2011).

Los niveles de CO_2 muestran variabilidad natural en la atmósfera, pero desde la revolución industrial han ido más allá de la cota natural de 280 a 390 ppm (Tans

y Conway, 2010); en tanto que, los programas de monitoreo de CH₄ desde 1980 indican que los niveles de este GEI se han incrementado a razón de 1% por año, considerando este incremento como principal contribuyente al calentamiento global y al cambio climático.

El CH₄ es un hidrocarburo producido en el rumen por bacterias anaerobias del dominio *Archea* (que utilizan CO₂ como aceptor terminal de electrones convirtiéndolo a CH₄), favoreciendo el cambio climático directamente a través de su interacción con la energía infrarroja e indirectamente a través de las reacciones atmosféricas de oxidación que producen CO₂ (Johnson y Johnson, 1995). Comparativamente con el CO₂, el CH₄ y el N₂O presentan potencial de calentamiento global o efecto invernadero (*GWP*) 28 a 295 veces superior (EPA, 2014).

El cambio climático, definido éste como cualquier cambio en las propiedades estadísticas de las variables o fenómenos atmosféricos, se traduce actualmente en condiciones climáticas extremas como variación de la temperatura media global (incremento de 1.1 a 2.9°C para “escenarios bajos” y de 2.4 a 6.4°C para “escenarios altos”), inundaciones, sequía, aumento de la incidencia de fenómenos naturales (tormentas, huracanes, deshielos, etc.) ya que las actividades antropogénicas, incluyendo la ganadería, han alterado los componentes atmosféricos y el ciclo normal del carbono (C) (Marshall, 2011).

El IPCC (Panel Intergubernamental para el Cambio Climático, 2007) ha declarado que la mayor parte del calentamiento global en las últimas décadas es debido al aumento de los GEI provenientes de fuentes antropogénicas más que de fuentes naturales. Sin embargo, en el Cuadro 1 se pueden observar similares emisiones anuales de CH₄ provenientes tanto de fuentes naturales como del uso de combustibles fósiles y de la actividad agropecuaria. Las mediciones isotopológicas de CH₄ (por ejemplo ¹³CH₄) proveen información confiable acerca de sus fuentes.

Cuadro 1. Estimativo de las principales fuentes naturales y antropogénicas de CH₄ a nivel global (Mt año⁻¹: megatoneladas año⁻¹).

Fuentes naturales		Energía/desechos		Agricultura	
Pantanos	115	Gas y petróleo	50	Cultivos de arroz	60
Océanos	15	Carbón mineral	40	Abonos orgánicos	10
Termitas	20	Carbón vegetal	10	Combustión	5
Combustión	10	Rellenos sanitarios	30	Animales domésticos	80
		Aguas residuales	25		
Total	160		155		155

Fuente: Johnson y Johnson, 1995.

Aunque gran parte de la polémica se centra en el impacto de la ganadería sobre el cambio climático, diversos autores (Reynolds *et al.*, 2010; Foley *et al.*, 2011; Henry *et al.*, 2012; Calzadilla *et al.*, 2013; Veerasamy *et al.*, 2015) analizaron las repercusiones del cambio climático sobre la ganadería, ya que emergerán enfermedades, se presentarán cambios en el contenido mineral del suelo, el rendimiento de los cultivos y la productividad del ganado debido a un clima desfavorable. Sin embargo, los efectos del calentamiento global no serán adversos en todas las partes del mundo: Thornton *et al.* (2007) pronostican un ligero incremento en la productividad de los cultivos ante un aumento de la temperatura promedio local de 1-3°C en latitudes medias y altas.

Las tendencias productivas actuales se orientan a la intensificación de los sistemas productivos (principalmente en Asia, USA y Latinoamérica), a la adopción de prácticas de mitigación de GEI a escala de pequeños y medianos productores pecuarios en Europa y África, a la manipulación genética de microorganismos ruminales, aplicaciones metagenómicas y selección de genotipos animales mejor adaptados. En general, estas tendencias posibilitan el desarrollo de Acciones Nacionales Apropriadas de Mitigación (NAMAs) encaminadas a la carbono-neutralidad y el concepto de una “*agricultura climáticamente inteligente*”, en relación a ecosistemas resilientes y seguridad alimentaria para provisión sostenible de proteínas de alto valor biológico a una población mundial creciente (Wheeler y Joachim, 2013; Vevoort *et al.*, 2014).

2.5 Emisiones de GEI globales y en Latinoamérica

En el Cuadro 2 se presentan las emisiones totales de GEI a nivel mundial, que ascienden a 45 268 Mt eCO₂, 13% de las cuales se relacionan con las actividades agropecuarias (IPCC, 2014).

El continente asiático es el mayor emisor de GEI tanto global como agrícola. Latinoamérica está situada en cuarto lugar, aportando 9.1% de las emisiones totales y 2.7% de las emisiones agrícolas, considerándose una región de alta vulnerabilidad al cambio climático, a pesar de su poca contribución a las emisiones globales.

Cuadro 2. Emisiones mundiales totales y aporte de GEI de la agricultura (Mt eCO₂).

Región	Emisiones totales	Emisiones agrícolas
Asia	22 351	2205
Europa	7086	730
Norteamérica	6982	539
Latinoamérica	4207	1162
África	4071	1259
Oceanía	571	136
Total	45 268	6031

Fuente: IPCC, 2014

En Latinoamérica, Brasil constituye el mayor emisor global y agrícola de GEI, mientras que en México el sector agrícola contribuye sólo con 12.3% del total de las emisiones del país (INEGI-SEMARNAT, 2010). Esta cifra contrasta con el 26% reportado por Gómez-Rosales *et al.* (2012), situándose fuera del rango promedio global de 14 a 30% de aporte de GEI para este sector (Harvey y Pilgrim, 2011).

2.6 Inventarios nacionales y estimación de emisiones ganaderas de GEI en México

México ha presentado cinco reportes oficiales (1996, 2001, 2006, 2009 y 2012) ante la Convención Marco de las Naciones Unidas sobre el Cambio Climático (CMNUCC) consistiendo en cuatro inventarios nacionales hasta el año 2009 y

un resumen de los mismos en el año 2012, como parte del compromiso de cuantificación y mitigación de GEI asumido por el país.

La tendencia de las emisiones de GEI de 1990 a 2010 en México es ilustrada en la figura 1, correspondiendo a emisiones de los tres principales GEI (CO_2 , CH_4 y N_2O) enunciados en el Anexo A del Protocolo de Kioto, con un incremento del 33.4% con respecto al año base (1990) y una tasa de crecimiento medio anual (TCMA) de 1.5% (INEGI-SEMARNAT, 2012).

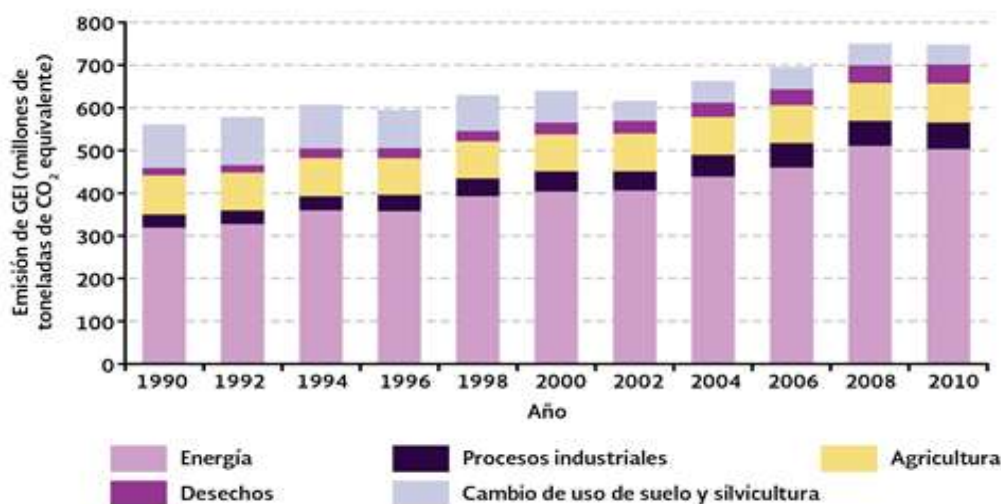


Figura 1. Evolución de las emisiones de GEI por sector en México

Fuente: INE-SEMARNAT, 2012

Para el inventario de GEI en el sector agrícola, con base en la metodología propuesta por el IPPC (1996), México cuenta con factores de emisión (FE) país específicos (nivel II) de CH_4 para fermentación entérica y del estiércol de ganado vacuno, bubalinos y cerdos (Ruiz-Suárez y González-Ávalos, 1997; González-Ávalos y Ruiz-Suárez, 2006), no así para pequeños rumiantes, equinos y aves de corral, que al igual que los cultivos de arroz, quema de residuos y emisiones desde suelos agrícolas utilizan sólo FE generales o por defecto (nivel I).

Se han encontrado diferencias significativas entre FE de CH₄ país-específicos y del IPCC (Bonillas y Lemus, 2012), lo cual es esperado considerando incertidumbre global de $\pm 50 \%$ para las estimaciones del IPCC nivel I; $\pm 20 \%$ para la cuantificación de GEI a partir de los valores nacionales, sub-regionales o provinciales en el nivel II, con parámetros más específicos por genotipos y efectos estacionales recién a nivel de finca para el nivel III (IPCC, 2006).

Modelos de simulación han sido propuestos para aumentar la precisión de las estimaciones de las emisiones de GEI. Utilizándolos, Castelán *et al.* (2014) estimaron emisiones totales de 2.02 Tg de CH₄ año⁻¹ por 23.3 millones de cabezas de ganado bovino en México (INEGI, 2010). La importancia de este estudio, cuyos resultados son presentados en el Cuadro 3, radica en la diferenciación por regiones climáticas en las que los forrajes difieren, constituyendo los forrajes de baja calidad la parte más importante de la dieta para el 86% de la población bovina de México (INEGI, 2007).

Cuadro 3. Ingesta promedio de materia seca y emisión de CH₄ ($\pm$ DE) simuladas para vacas en regiones cálidas y templadas de México

Componente	Región tropical y subtropical	Región templada
CMS, kg MS d ⁻¹	10.4 (1.4)	11.3 (2.4)
CH ₄ , MJ cabeza ⁻¹ d ⁻¹	17.6 (1.9)	15.6 (2.6)
CH ₄ , g cabeza ⁻¹ d ⁻¹	319.1 (35)	283.0 (47.6)
TCM, MJ/100MJ de EB	9.7 (0.3)	7.50 (0.4)
CH ₄ , kg cabeza año ⁻¹	116.8	103.5
Cabezas/región, millones	7.80	15.5
CH ₄ Kg/región, Tg año ⁻¹	0.34 (0.04)	0.6 (0.1)

DE = desviación estándar; CMS = consumo de materia seca; TCM = Tasa de conversión de CH₄ (MJ*100/MJ de Energía Bruta). Fuente: Castelán-Ortega *et al.* (2014)

Los resultados anteriores (Cuadro 3) fueron estimados simulando una dieta basada en *Cynodon spp* para la región tropical y subtropical, mientras que la de la región templada (abarcando el norte semiárido, el altiplano y la meseta

central del país) estuvo compuesta por una mezcla de *Pennisetum clandestinum*, *Sporobolus indicus*, *Eleocharis dombeyana* y *Trifolium amabile* (Rayas *et al.*, 2012).

Castelán *et al.* (2014) también destacaron que en México no se han desarrollado técnicas como el uso de trazadores o analizadores portátiles de gases para la medición *in vivo* o *in situ* de CH₄, que aporten FE precisos e incrementen la exactitud de los inventarios de GEI.

Concomitante a su importancia ambiental, la emisión de CH₄ es una vía de ineficiencia energética y económica, ya que representa pérdidas del 2 al 12% de la energía bruta (EB) contenida en los alimentos consumidos, que los animales no utilizan para la producción. Así, se estima que la energía que se pierde en forma de CH₄ es del orden del 6.5% (MJ de EB día⁻¹) que considerando: EB de 18.45 MJ. kg MS⁻¹ de los alimentos y valor energético de 55.65 MJ. Kg⁻¹ para el CH₄ equivalen a 21.6 kg CH₄. Kg de CMS⁻¹ en los inventarios nacionales de GEI (IPCC, 1996).

Un estudio de caso llevado a cabo en diez establos lecheros de tipo familiar del estado de Querétaro concluyó que los valores promedios de EB de los ingredientes de la ración ofrecida a las vacas fueron cercanos a los estimados con las ecuaciones del IPCC (2006), con variaciones entre los ingredientes de mínima y máxima densidad energética. Para ganado en corral, los mismos autores (Gómez-Rosales *et al.*, 2012) reportaron pérdidas de entre 2.7 y 6.3 pesos por animal día⁻¹ debidas a la emisión de CH₄. De este modo, las pérdidas económicas por emisión de metano en México pueden ser millonarias considerando la existencia actual de dos millones de cabezas de ganado lechero y treinta millones de ganado de engorda (SIAP, 2014).

2.7 Mitigación de las emisiones de GEI en pastoreo

Dado que la actividad agropecuaria contribuye ampliamente con las emisiones antropogénicas de GEI, los sistemas de producción animal “sostenibles”, deben aportar menores emisiones de esos gases.

Entre las estrategias de mitigación de las emisiones de GEI en los animales domésticos, las modificaciones dietético-nutricionales y la mejora de la eficiencia alimenticia, parecen tener el mayor potencial (Bonillas y Lemus, 2012).

Existe evidencia de que a mayor tecnificación se tiene menor impacto ambiental del sistema productivo, ya que con animales eficientes en la utilización del alimento se logran factores de emisión más bajos por unidad de producto. Por ejemplo, USA genera 16% de la producción láctea mundial, estando asociada dicha cadena productiva sólo al 8% de las emisiones de GEI de ese país (Rotz *et al.*, 2010).

Los impactos ambientales de la intensificación de la producción también fueron investigados a través de la comparación de regímenes orgánicos y convencionales. Thomassen *et al.* (2008) observaron menores emisiones de CH₄ en sistemas convencionales que en sistemas orgánicos. En contraste, Haas *et al.* (2001) no encontraron diferencias entre las emisiones de CH₄ del ganado manejado en sistemas intensivos de producción orgánica y convencional. Asimismo, Basset-Mens *et al.* (2009) en un estudio realizado con ganado lechero, informaron que un aumento de la intensidad de producción (en términos de producción ha⁻¹) conlleva a un aumento en las emisiones de GEI en Nueva Zelandia, donde se ha reportado hasta 90% de la producción de leche bajo estos sistemas referenciados como los más costo-eficientes (Dillon, 2006), contribuyendo en contraparte con 31.8% del total de GEI emitidos en ese país (Knight *et al.*, 2007).

Pinares-Patiño *et al.* (2009) afirman que los efectos del mejoramiento de la productividad animal sobre las emisiones de GEI sólo serán efectivos si paralelamente se reduce el número de rumiantes, ya que hasta el momento no existe ninguna mega-tecnología de mitigación para sistemas de producción basados en pastoreo.

Por su parte, mediciones de la producción de CH₄ de vacas en pastoreo indicaron reducción del 25% en las emisiones de CH₄ con pasturas mixtas de alfalfa-gramínea en comparación con sólo monocultivo de gramínea (7.1 vs 9.5% de la EB) (McCaughey *et al.*, 1999).

Las menores emisiones de GEI en sistemas mixtos o suplementados en comparación a los meramente pastoriles, pueden repercutir significativamente en las emisiones mundiales ya que según estimaciones de la FAO (2010), hasta 90% de la producción mundial de leche y 70% de la carne de rumiantes se produce bajo sistemas de pastoreo.

El efecto del concentrado sobre la metanogénesis se ha observado cuando el concentrado constituye más del 40% del CMS (Hristov *et al.*, 2013), razón por la cual siempre que el costo de la dieta lo permita y no se comprometa la digestibilidad de la fibra, la suplementación con concentrado se ha señalado como buena alternativa de mitigación de las emisiones de CH₄ para vacas en pastoreo, debido al incremento significativo en la producción de leche aun cuando la producción de CH₄ no disminuya *per se* (Lovett *et al.*, 2005).

Particularmente en los rumiantes en pastoreo, la disminución de digestibilidad de los nutrientes de la dieta aumenta la concentración de la materia orgánica fermentable en las heces, lo que puede incrementar las emisiones de CH₄ y N₂O a partir del estiércol (Powell y Broderick, 2011).

El efecto de la digestibilidad del alimento respecto a la reducción o incremento de la producción de CH₄ es en realidad controversial, siendo dependiente del sustrato y más evidente con la adición de fuentes ricas de carbohidratos

fermentables a la ración. Al ofrecer forrajes de alta (61.5 %), media (50.7 %) o baja (38.5 %) digestibilidad, consistentes en una mezcla de heno de gramínea y leguminosa, heno de gramínea de mediana y baja calidad, se encontró que la producción de CH₄ se incrementó conforme la digestibilidad del heno se redujo, (Boadi, y Wittenberg, 2002); aun cuando un incremento en la digestibilidad del forraje reduce las emisiones de CH₄, Hart (2009) reportó que el consumo y la producción de CH₄ fueron mayores con los forrajes de alta digestibilidad respecto a los de baja digestibilidad.

La mejora de la calidad nutritiva del forraje (principalmente mayor tenor de proteína cruda, PC) en las pasturas a menudo se acompaña de altas tasas de fertilización y excreción nitrogenada, por lo que la restricción del pastoreo y manejo del estiércol para delimitación de purines en el suelo, podrían evitar mayores emisiones de N₂O en el suelo (Luo *et al.*, 2008).

La alfalfa (*Medicago sativa*) contiene taninos condensados y saponinas que pueden reducir las emisiones de CH₄ entre 15 a 40% gracias a la transferencia de H₂ de los protozoarios a los microorganismos metanogénicos. Sin embargo, no todas las saponinas poseen el mismo efecto, por lo que no se ha podido establecer correlación entre defaunación y reducción de la metanogénesis (Andrade-Rivero *et al.*, 2012). Johnson y Johnson (1995) por su parte, propusieron también que las menores emisiones de CH₄ de las leguminosas respecto a las gramíneas se relacionan con el menor contenido de carbohidratos estructurales, mayor velocidad de pasaje y patrón orientado a la fermentación propiónica.

Las leguminosas también destacan por su gran capacidad de captura de GEI en el ecosistema, referenciándose fijación biológica de 60 a 770 kg N₂ ha⁻¹ año⁻¹ (Campillo *et al.*, 2003) y 3 t CO₂ ha⁻¹ año⁻¹. Fisher *et al.* (1995) indicaron que la cantidad de C acumulado en praderas monófitas de gramíneas fue marcadamente constante (3 ton ha⁻¹ año⁻¹) y que con la adición de un componente leguminoso aumentó 2.5 a 5 veces la tasa de acumulación de C, siendo este proceso limitado por el N.

Evaluaciones del grado de madurez con heno de *Brachiaria brizantha* cortado a 15, 45 y 90 días a novillos *Nellore* no reportaron efecto significativo de la edad de forraje al corte sobre la producción de CH₄, siendo ésta de 17.38, 23.41 y 20.02 gr de CH₄. kg MS⁻¹, respectivamente (Moysés do Nascimento *et al.* 2007) contrastando con Boadi *et al.* (2002) quienes reportaron que con pasturas mixtas tiernas de alfalfa-gramínea, la producción de CH₄ se redujo a 37% en comparación con el pastaje a mediados y fin de temporada. Robertson y Waghorn (2002) observaron que de las vacas lecheras pastoreando en primavera a verano tuvieron un incremento de 4.9 a 6.5% de pérdida de EB como CH₄, resaltando el efecto de la estacionalidad y madurez del forraje sobre dicha variable.

El tratamiento químico de forrajes de baja calidad y la selección de cultivos forrajeros de mayor digestibilidad reducen las emisiones de GEI por unidad de producto, siendo altamente recomendables como prácticas de mitigación, tanto para la fermentación ruminal como la del estiércol (Grainger y Beauchemin, 2011).

El compostaje reduce efectivamente la producción de CH₄, pero puede incrementar la producción de amoníaco (NH₃) y pérdidas totales de nitrógeno (N) con efecto variable sobre las emisiones de N₂O (Husfeldt *et al.*, 2012).

Los biodigestores anaeróbicos para generar CH₄ como fuente de energía son eficientes como opciones de mitigación pero sus efectos sobre la emisiones de N₂O son poco claros, afirmándose que el manejo y mantenimiento adecuado de los sistemas de digestión son importantes para evitar que se conviertan en emisores netos de GEI (Petersen y Sommer, 2011).

El mejoramiento genético ha posibilitado el aumento de la productividad y por ende, reducir el número de animales y las emisiones por unidad de producto (Capper *et al.*, 2009). Sin embargo, es también manifiesto el hecho de que las razas nativas se comportan mejor en sus ambientes naturales y que la

importancia de los factores genéticos aumenta a medida que mejora la nutrición.

En países como Australia se ha investigado ampliamente si existen bases genéticas entre los animales con mayores o menores emisiones de CH₄ (Cottle *et al.*, 2011); así mismo en Reino Unido, Canadá y otros países se han realizado cruzamientos entre ejemplares que producen descendencia menos metanogénica (Wall *et al.*, 2010).

De Hass *et al.* (2011) señalan que como es difícil medir directamente las tasas de emisión de CH₄, se pueden realizar mejoras por rasgos asociados como el CAR (MJ. día⁻¹, definido éste como la diferencia neta entre el consumo real y esperado en base al peso o “*performance*”) o mediante predicciones de la emisión de CH₄ (PEM, g. día⁻¹) a partir de la ingesta y composición de la dieta. Heredabilidades (h²) moderadas para CAR y PEM fueron de 0.40 y 0.35 respectivamente, con correlación genética positiva entre ambas, indicando que vacas con menor CAR tienen menor PEM, posibilitando seleccionar animales más eficientes; en tanto que el rango de variaciones genéticas (0.18 a 0.84) sugiere reducciones de emisión de CH₄ del 11 a 26% teóricamente posibles en 10 años.

Además del mejoramiento de la eficiencia productiva, el uso de biotecnologías e incremento de la eficiencia reproductiva del sistema posibilitan reducir el número de rumiantes y sus emisiones. Así por ejemplo, el aumento de la tasa de preñez y el volumen de producción de leche por vaca, reducen las tasas de reemplazo y emisiones de CH₄ hasta en un 16.5% (Berra y Finster, 2002).

Pocas especies de microorganismos metanogénicos han sido exitosamente aisladas y cultivadas, razón por la cual se han puesto en marcha proyectos de secuenciación genómica permitiendo identificación de procesos celulares y la manipulación genética de los mismos a través de un enfoque quimio- o metagenómico.

También se han identificado proteínas antigénicas permitiendo ensayar vacunas antimetanogénicas. Una de ellas ha sido elaborada con cepas aplicadas a ovinos sin encontrarse diferencia significativa en los niveles de CH₄ producido ni en el número de metanógenos respecto al grupo testigo. Sin embargo, se puede elaborar una vacuna altamente específica para ciertas cepas (Williams *et al.*, 2009). Aunque el grado de reducción metanogénica parece pequeña (<10%) y la adaptación y persistencia del efecto son poco conocidas se espera que las vacunas ofrezcan mayores oportunidades de mitigación en el futuro (Wedlock *et al.*, 2010).

Es probable un efecto atenuante moderado de los ionóforos en la emisión de CH₄ de rumiantes alimentados con dietas altas en granos o cereales forrajeros (Ellis *et al.*, 2012). Sin embargo, aunque en México no está restringido el uso de estos productos, el efecto de los ionóforos en los rumiantes en pastoreo no es lo suficientemente consistente para recomendarlos como estrategia de mitigación.

El uso de algunos microorganismos como levaduras secas activas podría tener moderado efecto mitigante de la emisión de CH₄ mediante mejora de la eficiencia alimenticia y la productividad animal, pero el efecto es discrepante e inconsistente (Poppy *et al.*, 2012). *Aspergillus oryzae* redujo las emisiones *in vitro* de CH₄ hasta en un 50% por defaunación (Frumholtz *et al.* 1989); la adición de *Saccharomyces cerevisiae* lo redujo en 10% por corto periodo (Mutsvangwa *et al.*, 1992); en tanto que al evaluar tres aditivos comerciales con dietas a base de alfalfa, no se encontró diferencia ($p>0.05$) respecto al testigo concluyéndose que al utilizar únicamente forraje como sustrato, las levaduras no tuvieron efecto debiéndose considerar además las cepas y dosis utilizadas (Grainger *et al.*, 2008).

Lo que sí se ha consolidado es la teoría de que los probióticos estimulan la acción de bacterias ácido-lácticas para crear un ambiente ruminal más estable que favorece el crecimiento de las bacterias celulolíticas y la digestión de la

fibra (Yoon y Stern, 1996; Chaucheyras-Durand y Durand, 2010; Puniya *et al.*, 2015).

Se cita que niveles de inclusión como 3% de lípidos en dietas altas en forrajes disminuye la emisión de CH₄, pudiendo impactar en los inventarios nacionales. En ovinos, la adición de aceite de palma, coco y canola al 5% de la MS, redujo en 34, 21 y 20% las emisiones de CH₄, en tanto que la adición de 3.5 a 7% de aceite de coco redujo la metanogénesis de 28 a 73% respectivamente (Machmüller y Kreuzer, 1999).

Los subproductos alimenticios ricos en aceite, como los granos de destilería (GDD) pueden ofrecer una alternativa económicamente factible como práctica de mitigación de la producción entérica de CH₄, aunque sus altos contenidos de fibra pueden tener efecto opuesto dependiendo de la composición de la dieta basal (McGinn *et al.*, 2009).

En síntesis, existen muchas estrategias generales para reducción de las emisiones GEI, que varían en su potencial de mitigación, factibilidad tecnológica y relación beneficio-costeo de adopción. Cabe destacar, que si bien el rango de disminución de la producción de CH₄ es en extremo variable (hasta 90 puntos porcentuales) debido a condiciones de alimentación, método de muestreo y técnicas analíticas, la amplia escala sugiere gran potencial para reducir de las emisiones entéricas (Bonillas y Lemus, 2012).

2.8 Reducción de las emisiones de GEI y productividad

La huella de carbono (HC) de la leche se sitúa entre 0.8 a 3 kg eCO₂. Kg de producto⁻¹ (Hagemann *et al.*, 2011). Como se ha indicado anteriormente, las emisiones entéricas de CH₄ representan una pérdida energética cuya reducción permitiría mejorar el rendimiento de los animales, lo cual no siempre se observa en la práctica ya que por ejemplo los metabolitos secundarios o fuentes de lípidos pueden deprimir también los parámetros productivos, mediado por la disminución en el CMS.

Paradójicamente, otros estudios en vacas lecheras sugieren que el uso de fuentes como semilla de canola o algodón en la alimentación no reducen las emisiones de CH₄ pero tienden a incrementar la eficiencia por unidad de producto (CH₄ kg⁻¹ de leche producido).

Por su parte, en el experimento llevado a cabo con 82 vacas lecheras utilizando cámaras de respiración durante el ordeño, se ha demostrado que la tasa de emisión de CH₄ se incrementa con el aumento de la producción diaria de leche durante los ordeños ($r = 0.71$), variando dicha tasa entre individuos con la misma producción y alimentados con la misma dieta como parte del error (Garnsworthy *et al.*, 2012).

Cuadro 4. Indicadores de las emisiones de CH₄ reportados por diferentes técnicas.

Referencias	Animales	PL (kg leche.d ⁻¹)	CH ₄ (L vaca. d ⁻¹)	CH ₄ (L. kg leche ⁻¹)
Kaharabata <i>et al.</i> (2000)	147 N (PV= SE)	–	631	–
Westberg <i>et al.</i> (2001)	4 VL (PV = 673)	22	623	28.3
Westberg <i>et al.</i> (2001)	4 VL (PV = 673)	22	566	25.7
Kirchgessner <i>et al.</i> (1991)	67 VL (PV = 583)	17	420	24.7
Sauer <i>et al.</i> (1998)	95 VL (PV = 600)	29	622	21.4
Kinsman <i>et al.</i> (1995)	118 VL (PV = 602)	28.5	552	19.4
Kaharabata <i>et al.</i> (2000)	90 VL (PV= 600)	28.5	542	19
Johnson <i>et al.</i> (2002)	36 VL (PV > 600)	39.1	637	17.3
Johnson <i>et al.</i> (2002)	36 VL (PV > 600)	32.3	543	16.8
Sechen <i>et al.</i> (1989)	6 VL (PV = 603)	37.1	557	15
Johnson <i>et al.</i> (2002)	36 VL (PV > 600)	39.3	550	14
Sechen <i>et al.</i> (1989)	6 VL (PV = 603)	41.3	470	11.4

VL: vacas lecheras; N: novillas; PV: kg de peso vivo

Fuente: Adaptado de Boadi *et al.*, 2004

El Cuadro 4, presenta referencias de producción de leche (PL), emisiones de CH₄ por animal (L animal día⁻¹) y por unidad de producto (L kg⁻¹ leche), notándose que para el rango de PL considerado (22 a 41.3 kg día⁻¹), los rangos de producción de CH₄ por animal y unidad de producto se redujeron (623 vs 470 L de CH₄ animal día⁻¹ y 28.3 vs 11.4 L CH₄ Kg⁻¹ de leche, respectivamente). Los valores superiores de estos rangos son cifras reportadas por la técnica del trazador SF₆ con tubos internos de permeación, y los menores por cámaras respiratorias, destacando gran variabilidad de acuerdo a las distintas técnicas de medición empleadas.

Batalla *et al.* (2015) mostrando la importancia de las praderas como sumideros de C, para ovejas en pastoreo reportaron huella ecológica de 2 a 5.2 kg eCO₂ Kg de leche corregida a grasa y proteína⁻¹, con diferencias por raza y sistema de producción, perdiendo efecto estos factores luego de considerar el balance de C.

Menor HC es esperada con la intensificación, sin embargo, debe considerarse el potencial de emisión nitrogenada de animales con alto mérito genético para la producción de leche (Chagunda *et al.*, 2009), emprender un enfoque integrado de producción de leche-carne como “*benchmarking*” por cambios en el uso del suelo (Flysjö *et al.*, 2012) y combinar la rentabilidad con bajas emisiones en los sistemas productivos (O'Brien *et al.*, 2010).

2.9. Literatura citada

- Andrade-Rivero, E., A. R. Martínez-Campos, O. A. Castelán-Ortega, J. Ríos-Quezada, Y. Pacheco-Ortega y J. G. Estrada-Flores. 2012. Producción de metano utilizando plantas taníferas como sustrato en fermentación ruminal *in vitro* y efecto de extractos fenólicos en la microflora ruminal. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 15: 301 - 312.
- Basset-Mens, C., S. Ledgard and M. Boyes. 2009. Eco-efficiency of intensification scenarios for milk production in New Zealand. *Ecological Economics* 68: 1615-1625.
- Beckman, J. and W. Weiss. 2005. Nutrient digestibility of diets with different fiber to starch ratios when fed to lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 88: 1015-1023.

- Belete, S. G. and A. Hassen. 2011. *In vitro* fermentation, digestibility and methane production of tropical perennial grass species. *Crop and Pasture Science* 65: 479–488.
- Berra, G y L. Finster. 2002. Emisión de gases de efecto invernadero. *Boletín de divulgación INTA* 8: 212-215.
- Benchaar, C., C. Pomar and J. Chiquette. 2001. Evaluation of dietary strategies to reduce methane production in ruminants: A modelling approach. *Canadian Journal of Animal Science* 81: 563-574.
- Benson, A., A. Scott, L. Ryan, M. Fangrui and J. Soo. 2010. Individuality in gut microbiota composition is a complex polygenic trait shaped by multiple environmental and host genetic factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107:18933-18938.
- Beuvink, J. M. and J. Kogut. 1993. Modeling gas production kinetics of grass silages incubated with buffered ruminal fluid. *Journal of Animal Science* 71: 1041-1046.
- Bhatta, R., K. Tajima, N. Takusari, K. Higuchi, O. Enishi and M. Kurihara. 2006. Comparison of sulfur hexafluoride tracer technique, rumen simulation technique and *in vitro* gas production techniques for methane production from ruminant feeds. In: *International Congress Series* 1293: 58–61.
- Bhatta, R., O. Enishi, N. Takusari, K. Higuchi, I. Nonaka and M. Kurihara. 2008. Diet effects on methane production by goats and a comparison between measurement methodologies. *Journal Agricultural Science* 146: 705–715.
- Blaxter, K. L. and J. L. Clapperton. 1965. Prediction of the amount of methane produced by ruminants. *British Journal Nutritional* 19: 511-522.
- Boadi, D., C. Benchaar, J. Chiquette and D. Massé. 2004. Stratégies visant à réduire les dégagements de méthane entérique des vaches laitières: bilan. *Canadian Journal of Animal Science* 84: 319–335.
- Bonillas, C., J. A. y F. C. Lemus. 2012. Emisión de metano entérico por rumiantes y su contribución al calentamiento global y al cambio climático. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias* 3: 215-246.
- Calzadilla, A., K. Rehman, R. Betts, P. Falloon, A. Wiltshire and R. Tol. 2013. Climate change impacts on global agriculture. *Climatic Change* 120: 357-374.
- Campillo, R., S. Urquiaga, I. Pino y A. Montenegro. 2003. Estimación de la fijación biológica de nitrógeno en leguminosas forrajeras mediante la metodología del ^{15}N . *Agricultura Técnica* 63: 169-179.
- Capper, J. L., R. A. Cady and D. E. Bauman. 2009. The environmental impact of dairy production: 1944 compared with 2007. *Journal of Animal Science* 87: 2160-2167.
- Carberry C., S. Watersa, D. Kenneya and C. Creeveya. 2014. Rumen methanogenic genotypes differ in abundance according to host residual feed intake phenotype and diet type. *Applied and Environmental Microbiology* 80: 586-594.
- Castelán-Ortega, O. A., J. C. Ku-Vera y J.G Estrada-Flores. 2014. Modeling methane emissions and methane inventories for cattle production systems in Mexico. *Atmósfera* 27: 185-191.

- Cersosimo, L. M and A. Wright. 2015. Estimation Methodologies for Enteric Methane Emission in Ruminants. In: V. Sejian, J. Gaughan, L. Baumgard, C. Prasad (Eds). Climate change impact on livestock: Adaptation and Mitigation. India. 209-220.
- Chai, W. Z., A. H. Van Gelder and J. W. Cone. 2004. Relationship between gas production and starch degradation in feed samples. *Animal Feed Science and Technology* 114: 195-204.
- Chattopadhyay, K. and F. Widjaja. 2014. Research Advances on Methanogens from Ruminants and their Applications. *Journal of Microbiological Studies* 1: 1-12.
- Chaucheyras-Durand, F. and H. Durand. 2010. Probiotics in animal nutrition and health. *Beneficial microbes* 1: 3-9.
- Coblentz, W. K., K. P. Coffey, A. N. Young and M. G. Bertram. 2013. Storage characteristics, nutritive value, energy content, and *in vivo* digestibility of moist, large rectangular bales of alfalfa-orchard grass hay treated with a propionic acid-based preservative. *Journal of Dairy Science* 96: 2521 – 2535.
- Cone, J. W., A. H. Van Gelder, G. J. Visscher and L. Oudshoorn. 1996. Influence of rumen fluid and substrate concentration on fermentation kinetics measured with a fully automated time related gas production apparatus. *Animal Feed Science and Technology* 61: 113-128.
- Cone, J. W., A. H. Van Gelder and F. Driehuis. 1997. Description of gas production profiles with a three-phasic model. *Animal Feed Science and Technology*. 66: 31-45.
- Cornou, C., I. K. Hindrichsen, H. Worgan, E. Bakewell, D. Yáñez Ruiz, L. Abecia, F. Tagliapietra, M. Cattani, I. Storm, C. Ritz and H. Hansen. 2012. A ring test of a wireless *in vitro* gas production system. *Animal Production Science* 53: 585-592.
- Cottle, A., J. Nolan and S. Wiedemann. 2011. Ruminant enteric methane mitigation: a review. *Animal Production Science* 51: 491-514.
- De Haas, Y., J. J. Windig, M. L. Calus, J. Dijkstra, M. De Haan, M. Bannink and R. F. Veerkamp. 2011. Genetic parameters for predicted methane production and potential for reducing enteric emissions through genomic selection. *Journal of Dairy Science* 94: 6122–6134.
- Denman, S. and C. McSweeney. 2015. The early impact of genomics and metagenomics on ruminal microbiology. *Annual Review of Animal Biosciences* 3: 447-465.
- Dillon, P. 2006. Achieving high dry matter intake from pasture with dairy cows. Fresh herbage for dairy cattle. In: A. Elgersma, J. Dijkstra and S. Tamminga (eds.). Springer. Houten. The Netherlands: 1-26.
- Dixon, R. M. and D. B. Coates. 2015. Application of faecal near infrared spectroscopy to manage the nutrition and productivity of grazing ruminants. In: Proceedings of the 1st International Conference on Forages in Warm Climates. Brazilian. 207-230.

- Ellis, J. L., J. Dijkstra, A. Bannink, E. Kebreab, S. E. Hook, S. Archibeque and J. France. 2012. Quantifying the effect of monensin dose on the rumen volatile fatty acid profile in high-grain fed beef cattle. *Journal of Animal Science* 90: 2717–2726.
- EPA. 2014. Methane and nitrous oxide emissions from natural sources. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, USA. Available in: <http://www3.epa.gov/climatechange/ghgemissions/gases/ch4.htm>. Accessed January 20, 2015.
- FAO (Food and Agriculture Organization). 2010. Gas emissions from the dairy sector. A life cycle assessment. Rome. Italy. 94 p.
- FAOSTAT (Food and agriculture Organization of the United Nations, Statistics Division). 2012. Available in: <http://faostat3.fao.org/home/E>. Accessed February 15, 2015.
- Fisher, M., I. Rao, C. Lascano, J. Sanz, R. Thomas, R. Vera and M. Ayarza. 1994. Pasture soils as carbon sink. *Nature* 371: 236-238.
- Foley J., N. Ramankutty, K. Brauman, E. Cassidy, J. Gerber, M. Johnston, N. Mueller, C. O’Connell, D. Ray, P. West, C. Balzer, E. Bennett, S. Carpenter, J. Hill, C. Monfreda, S. Polasky, J. Rockström, J. Sheehan, S. Siebert, D. Tilman and D. Zaks. 2011. Solutions for a cultivated planet. *Nature* 478: 337–342.
- Frumholtz P., Newbold C. and R. Wallace. 1989. Influence of *Aspergillus oryzae* fermentation extract on the fermentation of a basal ration in the rumen simulation technique (Rusitec). *Journal Agricultural Science* 113: 169-172.
- Garnsworthy, P., J. Craigon, J. Hernandez-Medrano and N. Saunders. 2012. On-farm methane measurements during milking correlate with total methane production by individual dairy cows. *Journal of Dairy Science* 95: 3166–3180.
- Getachew, G., M. Blümmel, H. P. Makkar and K. Becker. 1998. *In vitro* measuring techniques for assessment of nutritional quality of feeds: a review. *Animal Feed Science and Technology* 72: 261-281.
- GLEAM-FAO (Global Livestock Environmental Assessment Model-Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2014. Available in: http://www.fao.org/ag/againfo/home/en/news_archive/2015_GLEAM_environmental_impacts.html. Accessed August 21, 2015.
- Gómez-Rosales, S., M. L. Ángeles and J. A. Bonilla-Cárdenas. 2012. Tecnologías para reducir las emisiones de metano en rumiantes. Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Fisiología y Mejoramiento Animal, INIFAP-SAGARPA. Libro Técnico No. 2, Colón, Querétaro. P.10.
- González–Avalos, E. and L.G. Ruíz–Suárez. Methane conversion factors from cattle manure in México. *Atmósfera* 20: 83–92.
- Grainger, C., M. J Auldist, T. Clarke, K. A. Beauchemin, S. M McGinn, G. C. Hannah, J. Eckard and L. B. Lowe. 2008. Use of monensin controlled-release capsules to reduce methane emissions and improve milk production in dairy cows offered pasture supplemented with grain. *Journal of Dairy Science* 91: 1159-1165.

- Grainger, C. and K. Beauchemin. 2011. Can enteric methane emissions from ruminants be lowered without lowering their production? *Animal Feed Science and Technology* 23: 308–320.
- Grant, R. 2005. Optimizing starch concentrations in dairy rations. In: *Proceedings of Tri-State Dairy Nutrition Conference*: 73-77.
- Groot, J. C., J. W. Cone, B. A. Williams, F. M. Debersaques and E. A. Lantinga. 1996. Multiphasic analysis of gas production kinetics for *in vitro* fermentation of ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology* 64: 77-89.
- Guan, L., J. Nkrumah, J. Basarab and S. Moore. 2008. Federation of European Microbiological Societies (FEMS) *Microbiology* 288: 85-91.
- Haddad, S. and R. Grant. 2000. Influence of nonfiber carbohydrate concentration on forage fiber digestion *in vitro*. *Animal Feed Science and Technology* 86: 107-115.
- Hart, K. J., P. G. Martin, P. A. Foley, D. A. Kenny and T.M. Boland. 2009. Effect of sward dry matter digestibility on methane production, ruminal fermentation and microbial populations of zero-grazed beef cattle. *Journal of Animal Science* 87: 3342-3350.
- Hass, G., F. Wetterich and U. Kopke. 2001. Comparative intensive, extensified and organic grassland farming in southern Germany by process life cycle assessment. *Agriculture, Ecosystem and Environmental* 83: 43-53.
- Harvey, M. and S. Pilgrim. 2011. The new competition for land: food, energy, and climate change. *Food Policy* 26: 40-51.
- Henry, B., E. Charmley, R. Eckard, J. Gaughan and R. Hegarty. 2012. Livestock production in a changing climate: adaptation and mitigation research in Australia. *Crop and Pasture Science* 63: 191–202.
- Hermansen, J. and T. Kristensen. 2011. Management options to reduce the carbon footprint of livestock products. *Animal Frontiers* 1: 1-3.
- Hook, S., A. Wright and B. McBride. 2010. Methanogens: Methane Producers of the Rumen and Mitigation Strategies. *Archaea* 2010: P. 11.
- Hristov, A., L. Firkins, J. Dijkstra, E. Kebreab, G. Waghorn, H. Makkar, A. Adesogan, W. Yang, C. Lee, P. Gerber, B. Henderson and J. Tricarico. 2013. Special topic — Mitigation of methane and nitrous oxide emissions from animal operations: a review of enteric methane mitigation options. *Journal of Animal Science* 91: 5045-5069.
- Husfeldt, A., M. Endres, J. Salfer and K. Janni. 2012. Management and characteristics of recycled manure solids used for bedding in Midwest freestall dairy herds. *Journal of Dairy Science* 95: 2195–2203.
- INECC (Instituto Nacional de Ecología y Cambio climático). 2008. Actualización del Inventario Nacional de Gases de Efecto Invernadero 1990-2010 para el Sector Agricultura. INEGI, México. P. 293.
- INEGI (Instituto Nacional de Estadística y Geografía). 2007. Censo Agrícola, Ganadero y Forestal. México. P 141.
- INE-SEMARNAT (Instituto Nacional de Estadística-Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales). 2010. Cuarta Comunicación ante la Convención Marco de las Naciones Unidas sobre Cambio Climático. México. P. 279.

- INE-SEMARNAT (Instituto Nacional de Estadística-Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales). 2012. Quinta Comunicación ante la Convención Marco de las Naciones Unidas sobre Cambio Climático. México. P. 340.
- IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change). 1996. Revised 1996 Guidelines for National Greenhouse Gas Inventories. In: J. Houghton, L. Meira, B. Lim., K. Tréanton, I. Mamaty, Y. Bonduki, D. Griggs and B. Callander (eds.). Workbook 2 (4): P. 67.
- IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change). 2006. National Greenhouse Gas Inventories Programme. In: H. Eggleston, L. Buendia, K. Miwa, T. Ngara and K. Tanabe (eds). Japan. P.38.
- IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change). 2007. Climate change: Synteshis report. In: Pachauri R. and A. Reisinger (eds). Switzerland. P.104.
- IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change). 2014. Summary for Policemakers. In: R. Pachauri and L. Meyer (eds). P. 32.
- Johnson, K. A., M. Huyler, C. S. Pierce, H. Westberg, B. Lamb and P. Zimmerman. 1992. The use of SF₆ as an inert gas tracer for use in methane measurements. *Journal of Animal Science* 70: 302-308.
- Johnson, K. A. and D. E. Johnson. 1995. Methane emissions from cattle. *Journal of Animal Science* 73: 2483–2492.
- Johnson, D. and G. Ward. 1996. Estimates of animal methane emissions. *Environmental Monitoring and Assessment* 42: 133-141.
- Johnson, K., H. Westberg, B. Lamb and R. Kincaid. 2002. The use of sulfur hexafluoride for measuring methane emissions from farm animals. In: International Conference on Greenhouse Gases and Animal Agriculture. Japan: 72-81.
- Johnson, K., R. Kincaid, H. Westberg, C. Gaskins, B. Lamb and J. Cronrath. 2002. The effect of oilseeds in diets of lactating cows on milk production and methane emissions. *Journal of Dairy Science* 85: 1509–1515.
- Kajikawa, H., C. Valdes, K. Hillman, R. J. Wallace and C. J. Newbold. 2003. Methane oxidation and its coupled electron-sink reactions in ruminal fluid. *Journal of Applied Microbiology* 36: 354-357.
- Kinsman, R., F. D. Sauer, H. A. Jackson and M. S. Wolynetz. 1995. Methane and carbon dioxide emissions from cows in full lactation monitored over a six-month period. *Journal of Dairy Science* 78: 2760-2766.
- Knight, T. W., G. Molano, W. Nichols and H. Clark. 2007. Effect of feeding Caucasian clover, ryegrass and combinations of ryegrass and clovers on the methane emissions of wether lambs. In: Greenhouse Gases and Animal Agriculture Conference. New Zealand: LVI-LVII.
- Lassey, K. R., Pinares-Patiño C. S., R. J. Martin, G. Molano and A. McMillan. 2011. Enteric methane emission rates determined by the SF₆ tracer technique: temporal patterns and averaging periods. *Animal Feed Science and Technology* 166: 183-191.
- Liu, J. X., A. Susenbeth and H. Südekum. 2002. *In vitro* production measurements to evaluate interactions between untreated and chemically

- treated rice straws, grass hay and mulberry leaves. *Journal of Animal Science* 80: 517-524.
- López, S., M. D. Carro, J. S. González, and F. Ovejero. 1998. Comparison of different *in vitro* and *in situ* methods to estimate the extent and rate of degradation of hays in the rumen. *Animal Feed Science and Technology*. 73: 99-113.
- Lovett, D. K., L. J. Stack, S. Lovell, J. Callan, B. Flynn, M. Hawkings and F. P. O'Mara. 2005. Manipulating enteric methane emissions and animal performance of late-lactation dairy cows through concentrate supplementation at pasture. *Journal of Dairy Science* 88: 2836-2842.
- Machmüller, A. and M. Kreuzer. 1999. Methane suppression by coconut oil and associated effects on nutrient and energy balance in sheep. *Canadian Journal of Animal Science* 79: 65–72.
- Makkar, H. 2001. Recent advances in *in vitro* gas method for evaluation of nutritional quality of feed resources. Available in: http://www.fao.org/DOCREP/ARTICLE/AGRIPPA/570_EN_toc.htm cuando. Consultado el 20 de junio de 2014.
- Mauricio, R. M. 1999. Comparison of bovine rumen liquor and bovine feces as inoculum for an *in vitro* gas production technique for evaluating forage. *Ph.D. Thesis*. The University of Reading, United Kingdom. P. 281.
- Marshall, S. J. 2011. Carbon, climate change, and controversy. *Animal Frontiers* 1: 1-5.
- McCartney, C., I. Bullb and R. Dewhursta. 2014. Using archaeol to investigate the location of methanogens in the ruminant digestive tract. *Livestock Science* 164: 39–45.
- McCaughey, W., Wittenberg, K. and D. Corrigan. 1999. Impact of pasture type on methane production by lactating beef cows. *Journal of Animal Science* 79: 221-226.
- McGinn, S. M., Y.-H. Chung, K. A. Beauchemin, A. D. Iwaasa and C. Grainger. 2009. Use of corn distillers dried grains to reduce enteric methane loss from beef cattle. *Canadian Journal of Animal Science* 89: 409–413.
- Menke, K. H. and H. Steingass. 1988. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. *Animal Research and Development* 28: 7-55.
- Mindson, D. 2012. Ruminant Production and Forage Nutrients. In: *Forage in Ruminant nutrition*. Academic Press. San Diego, USA. P.108.
- Montzka, S. A., E. J. Dlugokencky and J. H. Butler. 2011. Non-CO₂ greenhouse gases and climate change. *Nature* 476: 43-50.
- Mould, F. L, K. E. Kliem, R. Morgan and R. M. Mauricio. 2005. *In vitro* microbial inoculum: A review of its function and properties. *Animal Feed Science and Technology* 123: 31-50.
- Moyes do Nascimento, C., J. Assumpção de Abreu, A. Berndt and R. Mazza. 2007. Methane emissions by Nelore beef cattle consuming *Brachiaria brizantha* with different stages of maturation In: *Greenhouse Gases and Animal Agriculture Conference*. New Zeland: LXIV-LXV.
- Mutsvangwa, T., I. Edwards, J. Topps and G. Paterson. 1992. The effect of dietary inclusion of yeast culture (Yea-Sacc) on patterns of rumen

- fermentation, food intake and growth of intensively fed bulls. *Animal Production* 55: 35-40.
- Navarro-Villa, A. M. O'Brien, S. López, T. M. Boland and P. O'Kiely. 2011. *In vitro* rumen methane output of red clover and perennial ryegrass assayed using the gas production technique (GPT). *Animal Feed Science and Technology* 168: 152-164.
- Nsahlai, I., N. Umunna and D. Negassa. 1995. The effect of multi-purpose tree digesta on *in vitro* gas production from napier grass or neutral-detergent fibre. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 69: 519-528.
- Noguera, R. y S. Posada. 2005. Técnica *in vitro* de producción de gases: Una herramienta para la evaluación de alimentos para rumiantes. *Livestock Research for Rural Development* 17 (4): 15.
- Noguera, R., C. Ramírez, y D. Bolívar. 2006. Efecto de la inclusión de papa (*Solanum tuberosum*) en la cinética de fermentación *in vitro* del pasto kikuyo (*Pennisetum clandestinum*). *Livestock Research for Rural Development* (18): 5.
- O'Mara, F. P. 2000. A Net Energy System for Cattle and Sheep. Version 1.2. University College, Dublin, Ireland. P. 90.
- Odongo, N., R. Bagg, G. Vessie, P. Dick, M. Or-Rashid, S. Hook and J. Gray. 2007. Long-term effects of feeding monensin on methane production in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 90: 1781-1788.
- Opatpatanakit, Y., R. Kellaway, I. Lean, G. Annison and A. Kirby. 1994. Microbial fermentation of cereal grains *in vitro*. *Australian Journal of Agricultural Research* 45: 1247-1263.
- Ørskov, E. R., G. Reid and M. Kay. 1979. Prediction of intake by cattle from degradation characteristics of roughages. *Animal Production Science* 46: 29-34.
- Patra, A. and J. Saxena. 2010. A new perspective on the use of plant secondary metabolites to inhibit methanogenesis in the rumen. *Phytochemistry* 71: 1198-1222.
- Patra, A. 2013. The effect of dietary fats on methane emissions, and its other effects on digestibility, rumen fermentation and lactation performance in cattle: a meta-analysis. *Livestock Production Science* 155: 244-254.
- Pell, N., P. Doane and P. Schofield. 1997. *In vitro* digestibility and gas production. In: Simpósio sobre Tópicos Especiais em Zootecnia. Minas Gerais, Brasil. 109 – 132.
- Pell, N. and P. Schofield 1993. Computerized monitoring of gas production to measure forage digestion *in vitro*. *Journal of Dairy Science* 76: 1063-1073.
- Pinares-Patiño, C., C. Waghorn, R. Hegarty and S. Hoskin. 2009. Effects of intensification of pastoral farming on greenhouse gas emission in New Zealand. *New Zealand Veterinarian Journal* 57: 252-261.
- Pitesky, M., K. Stackhouse and F. Mitloehner. 2009. Clearing the air: livestock's contribution to climate change. *Advances in Agronomy* 103: 1-40.
- Primavesi O., F. Shiraishi, P. Dos Santos, L. Aparecida, B. Teresinha e B. Franklin. 2004. Metano entérico de bovinos leiteiros em condições tropicais brasileiras. *Pesquisa Agropecuaria Brasil* 39 (3): 277-283.

- Petersen, S. and S. Sommer. 2011. Ammonia and nitrous oxide interactions: Roles of manure organic matter management. *Animal Feed Science and Technology* 167: 503–513.
- Poppy G., A. Rabiee, I. Lean, W. Sanchez, K. Dorton and P. Morley. 2012. A meta-analysis of the effects of feeding yeast culture produced by anaerobic fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* on milk production of lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 95: 6027–6041.
- Powell, J. M. and G. A. Broderick. 2011. Transdisciplinary soil science research: Impacts of dairy nutrition on manure chemistry and the environment. *Soil Science Society of America Journal* 75: 2071–2078.
- Puniya, K., A. Salem, S. Kumara, S. Dagara, G. Griffiths, S. Ravellad, N. Kumara, T. Dhewae and R. Kumara. 2015. Role of live microbial feed supplements with reference to anaerobic fungi in ruminant productivity: a review. *Journal of Integrative Agriculture* 14: 550-560.
- Rayas-Amor, A. A., J. Estrada-Flores, F. Lawrence-Mould and O. Castelán-Ortega, 2012. Nutritional value of forage species from the central highlands region of Mexico at different stages of maturity. *Ciencia Rural* 42: 705-712.
- Reynolds, C. K., L. A. Crompton and J. A. Mills. 2010. Improving the efficiency of energy utilization in cattle. *Animal Production Science* 51: 6-12.
- Robertson, L. and G. Waghorn. 2002. Dairy industry perspectives on methane emissions and production from cattle fed pasture or total mixed rations in New Zealand. *Proceedings New Zealand Society of Animal Production* 62: 213–218.
- Rosero, J. 2002. Estudo químico, "*in situ*", "*in vitro*" e microscópico da parede celular de cinco genótipos de sorgo colhidos em três épocas de corte. *Ph. D. Thesis*. Belo Horizonte: Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais. P. 148.
- Rotz, C., F. Montes and D. Chianese. 2010. The carbon footprint of dairy production systems through partial life cycle assessment. *Journal of Dairy Science* 93: 1266-1282.
- Ruiz-Suárez, L. and E. González-Avalos. 1997. Modeling methane emissions from cattle in México. *Science of the Total Environment* 306:177–186.
- Russell, J. B., J. D. O'Connor, D.G.Fox, P.Van Soest and C.J. Sniffen.1992. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets. *Journal of Animal Science* 70: 3551-3556.
- Russell, J.B. 1998. The importance of pH in the regulation of ruminal acetate to propionate ratio and methane production *in vitro*. *Journal of Dairy Science* 81: 3222–3230.
- Shabi, Z., I. Bruckental, S. Zamwell, H. Tagari and A. Arieli. 1999. Effects of extrusion of grain and feeding frequency on rumen fermentation, nutrient digestibility, and milk yield and composition in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 82:1252-1260.
- Stefanon, B., A. Pell and P. Schofield.1996. Effect of maturity on digestion kinetics of water-soluble and water-insoluble fractions of alfalfa and brome hay. *Journal of Animal Science* 74: 1104-1115.

- Stalker, L. A., B. G. Lorenz, N. A. Ahern and T. J. Klopfenstein. 2013. Inclusion of forage standards with known *in vivo* digestibility in *in vitro* procedures. *Livestock Science* 151: 1989-2002.
- Steinfeld, H., P. Gerber, T. Wassenaar, V. Castel, M. Rosales and C. De Haan. 2006. *Livestock's Long Shadow: Environmental issues and options*. Rome, Italy. P. 493.
- Storm, I., A. Hellwing, I. Nicolaj and J. Madsen. 2012. Methods for measuring and estimating methane emission from ruminants: review. *Animal* 2 (2): 160-183.
- Schofield, P. 2000. Gas Production Methods. In: *Farm Animal Metabolism and Nutrition*. CAB International. Wallingford (UK). P. 450.
- Schofield, P., R. Pitt and A. Pell. 1994. Kinetics of fiber digestion from *in vitro* gas production. *Journal of Animal Science* 72: 2980-2991.
- Tagliapietra, F., M. Cattani, I. K. Hindrichsen, H. Hansen, H. Hanne, H., S. Colombini, L. Bailoni and S. Schiavon. 2012. True dry matter digestibility of feeds evaluated *in situ* with different bags and *in vitro* using rumen liquor collected from intact donor cows. *Animal Production Science* 52: 338–346.
- Tans P. and T. Conway. 2010. Trends in atmospheric carbon dioxide. NOAA/ESR. Available en: www.esrl.noaa.gov/gmd/ccgg/trends. Accessed 15 March, 2015.
- Theodorou, M. K., B. A. Williams, M. S. Dhanoa, A. B. McAllan and J. France. 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology* 48: 185-197.
- Thornton, P. K, M. Herrero, H. A. Freeman, A. O. Mwai, E. Rege, P. G. Jones and J. McDermott. 2007. Vulnerability, climate change and livestock-opportunities and challenges for the poor. *Journal of Semi-Arid Tropical Agricultural Research* 4(1): 1-23.
- Thornton, P. K and M. Herrero. 2010. Potential for reduced methane and carbon dioxide emissions from livestock and pasture management in the tropics. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107: 19667-19672.
- Thomassen, M., K. Calke, M. Smits, G. Lepema and I. de Boer. 2008. Life cycle assessment of conventional and organic milk production in the Netherlands. *Agricultural Systems* 96: 95-107.
- Van Milgen, J., M. Murphy and L. Berger. 1991. A compartmental model to analyze ruminal digestion. *Journal of Dairy Science* 74: 2515-2529.
- Veerasamy, S., I. Hyder, T. Ezeji, J. Lakritz, R. Bhatta, J. Ravindra, C. Prasad, R. Lal. 2015. Introduction to concepts of Climate Change Impact on Livestock and Its Adaptation and Mitigation. In: V. Sejian, J. Gaughan, L. Baumgard and C. Prasad (eds). *Global warming: role of livestock. Climate change*. 141-169.
- Wall, E., G. Simma, D. Moran. 2010. Developing breeding schemes to assist mitigation of greenhouse gas emissions. *Animal* 1 (4): 366-376.
- Wang, M., S. X. Tang, S. X. Tan. 2011. Modeling *in vitro* gas production kinetics: Derivation of Logistic-Exponential (LE) equations and comparison of models. *Animal Feed Science and Technology* 165: 137-150.

- Wedlock D., G Pedersen, M. Denis, D. Dey, P. Janssen, B. Buddlea. 2010. Development of a vaccine to mitigate greenhouse gas emissions in agriculture: vaccination of sheep with methanogen fractions induces antibodies that block methane production *in vitro*. New Zealand Veterinary Journal 58: 29-36.
- Weimer, P. J. 1998. Manipulating ruminal fermentation: a microbial ecological perspective. Journal of Animal Science 76: 3114 – 3122.
- Weimer, P. J., G. Waghorn, C. Odt and D. Mertens. 1999. Effect of diet on populations of three species of ruminal cellulolytic bacteria in lactating dairy cows. Journal of Dairy Science 82: 122–134.
- Wheeler T. and V. Joachim. 2013. Climate change impacts on global food security 341: 508-513.
- Williams, B. 2000. Cumulative gas-production techniques for forage evaluation. In: Forage Evaluation in Ruminant Nutrition. CAB International. Wallingford (UK). P.475.
- Williams, Y. J., S. Popovsky, S. M. Rea, L. C. Skillman, A. F. Toovey, K. S. Northwood and A. D. Wright. 2009. A vaccine against rumen methanogens can alter the composition of archaeal populations. Applied and Environmental Microbiology 75(7): 1860-1866.
- Yoon, K. and M. Stern. 1996. Effects of *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus oryzae* cultures on ruminal fermentation in dairy cows. Journal of Dairy Science 79: 411-417.
- Zhang, C. M., Z. D. Yuan, X. W. Yi, W. T. Li, Y. Q. Guo, W. Ym, J. K. Wang, J. X. Liu and W. Y. Zhu. 2007. Effect of forage/concentrate ratio and ethyl linolate level on methane emission and fermentation parameters of Huzhou sheep. In: Greenhouse Gases and Animal Agriculture Conference. New Zealand: XCVIII-XCI.

3. RESUMEN GENERAL

ÍNDICES DE CONTAMINACIÓN ATMOSFÉRICA Y PRODUCTIVIDAD DE VACAS JERSEY Y SUS CRUZAS CON HOLSTEIN EN PASTOREO

La fermentación *in vitro* representa una técnica útil y asequible para valorar la degradabilidad y emisión de gases de efecto invernadero (GEI) de insumos utilizados para la alimentación de rumiantes. Aunado a ello, avances metagenómicos sugieren interacción del huésped y el microbioma ruminal, por lo que el objetivo general de la presente investigación fue evaluar el efecto de la pradera (mixta de gramínea-leguminosa vs. avena), del tipo de forraje (ofrecido vs. residual), del genotipo (*Jersey* (JY) y sus cruza con *Holstein* (HJ)) y sus interacciones significativas sobre mediciones repetidas de variables de fermentación *in vitro* y productividad a 24 horas en un sistema de producción de leche en pastoreo. En el capítulo 3.1 los forrajes y el líquido ruminal de cada vaca y genotipo fueron incubados para obtener la materia seca digerida por día (MSDd) y los volúmenes *in vitro* de CO₂ y CH₄ + gases menores. A partir de estos gases se calcularon los índices de contaminación atmosférica (ICAs) específicos por CH₄, CO₂ (ICH₄ e ICO₂) y total (ICAT) por día y expresados en función de la producción diaria de leche (PL), proteína (PROT) y grasa (GRAS). En conclusión, la pradera tuvo efecto consistente sobre los ICAs diarios y en función a la productividad, masa de forraje y genotipo sobre la digestibilidad y el genotipo sobre proteína-grasa de la leche, sin interacciones significativas de estos efectos sobre las variables de estudio. En el capítulo 3.2 se evaluó la digestibilidad *in vitro* de la materia seca del forraje (DIVMS24) incubándola también por animal y genotipo, presentándose efecto del tipo de forraje (ofrecido>residual), genotipo (JY>HJ) y la interacción significativa del genotipo y día de muestreo (64.2, 60.8% para JY y 54.0, 57.4% para HJ en pradera mixta y avena respectivamente, e.e.d=1.31), concluyéndose que el genotipo JY presenta mayor capacidad para aprovechar las praderas del sistema de pastoreo.

Palabras claves: fermentación *in vitro*; digestibilidad; GEI, Jersey; Cruzas.

3. OVERALL SUMMARY

INDEXES OF ATMOSPHERIC POLLUTION AND PRODUCTIVITY OF JERSEY COWS AND THEIR CROSSES WITH HOLSTEIN IN A GRAZING DAIRY SYSTEM

The *in vitro* fermentation is a useful and affordable technique to assess the degradability and greenhouse gas emission (GHG) from feedstuffs for ruminants. Additionally, metagenomic approaches suggest an interaction between the host and the ruminal microbiome. The overall objective of this research was to evaluate the effect of pasture type (mixed grass-legume vs. oat pasture), herbage mass type (pre- vs. post-grazing), and animal's genotype (*Jersey*, JY vs. *Holstein-Jersey Crossbreed*, HJ) on 24-hour pasture dry matter *in vitro* fermentation and cow productivity on a milk production system from grazed pasture. In Chapter 3.1, the forages and the ruminal liquor of each animal and genotype were incubated during 24 hours to get the daily dry matter digested (DMDd) and the *in vitro* CO₂ and CH₄ + minor gases volumes. From these gas volumes, indexes of atmospheric pollution (IAPs) for CO₂, CH₄, (ICH₄, CO₂) and total (IAPT) were calculated. The IAPs were calculated daily and expressed on a per kg of milk (ML), protein (PROT) or fat (FAT) basis. In conclusion, the pasture had consistent effect on daily IAP's and related to the productivity, herbage mass type and genotype on the digestibility and genotype on protein-fat milk, interactions of these effects were non-significant on the variables studied. In Chapter 3.2, the 24-hour *in vitro* dry matter digestibility (IVDMD24) is evaluated using from ruminal liquor from JY and HJ. Effects of forage type (offered > residual), cow genotype (JY > HJ) and the interaction of genotype and day of sampling (64.2, 60.8% for JY and 54.0, 57.4% for HJ in mixed and oat pasture respectively, s.e.d=1.31) were found. In conclusion, JY genotype had greater ability to take advantage of the available grasslands from the grazing system.

Key words: *in vitro* fermentation; digestibility; GHG, Jersey, crosses.

Master of Science Thesis, Universidad Autónoma Chapingo

Author: Luisa María Elvira Cáceres Ocampos

Advisor: Ph.D. José Guadalupe García Muñiz

3.1 *IN VITRO* GREENHOUSE EMISSIONS, INDEX OF ATMOSPHERIC POLLUTION AND PRODUCTIVITY FROM JERSEY DAIRY COWS AND THEIR CROSSES WITH HOLSTEIN IN MIXED AND OAT PASTURE

3.1.1 Resumen

La cuantificación de dióxido de carbono (CO₂) y metano (CH₄) que representan los principales gases de efecto invernadero (GEI) emitidos por el sector pecuario y la proposición de índices de contaminación atmosférica (ICAs), constituyen herramientas facilitadoras para estudios de impacto ambiental (EIA) y desarrollo de estrategias de gestión ambiental. La presente investigación tuvo por objetivo evaluar el efecto del tipo de pradera (mixta de gramínea-leguminosa vs. avena), tipo de masa de forraje (ofrecida vs. residual) y el genotipo de la vaca (Jersey, JY vs. Cruzas de Jersey con Holstein, HJ) sobre los ICAs y la productividad. Los forrajes y el líquido ruminal de cada vaca y genotipo fueron incubados por 24 horas para obtener la materia seca digerida por día (MSDd) y los volúmenes *in vitro* de CO₂ y CH₄ + gases menores. A partir de los volúmenes de estos gases se calcularon los ICAs específicos por CO₂ y CH₄, (ICO₂ y ICH₄) y total (ICAT) por día y expresados en función de la producción diaria de leche (PL), proteína y grasa. La pradera de avena generó valores más altos ($p < 0.05$) que la pradera mixta para ICH₄ (184.5 vs 551.1, e.e.d=54), ICO₂ (717.4 vs 399.0, e.e.d=55) e ICAT (16230 vs 5564, e.e.d=1464). La masa de forraje (2.948 vs. 2.727, e.e.d=52.6 para ofrecido>residual) y genotipo (2.990 vs 2.685, e.e.d=52.6 para JY>HJ) tuvieron efecto sobre la MSDd. Diferencias en el peso vivo, PL y consumo estimado de materia seca no fueron observadas entre genotipos, sin embargo, el porcentaje de grasa (5.49 vs 4.80, e.e.d=0.14) y de proteína (3.79 vs 3.62, e.e.d=0.05) en leche fue mayor para HJ que para JY ($p < 0.05$). Se concluye que la pradera tuvo efecto consistente sobre los ICAs diarios y en su relación con la productividad. La masa de forraje y genotipo afectaron la digestibilidad, y el genotipo la proteína y grasa de la leche, sin interacciones significativas de estos efectos en las variables de estudio.

Palabras claves: *in vitro*, emisiones; índices; GEI; EIA.

Tesis de Maestría en Ciencias en Innovación Ganadera, Universidad Autónoma Chapingo
Autor: Luisa María Elvira Cáceres Ocampos
Director: Dr. José Guadalupe García Muñiz

3.1.2 Abstract

The measurement of carbon dioxide (CO₂) and methane (CH₄) that represent the major greenhouse gases (GHG) emitted from the livestock sector and the suggestion of indexes of atmospheric pollution (IAP), are useful tools for both assessing environmental impact of livestock systems and the development of strategies to diminish their environmental impact. The objective of this research was to evaluate the effect of type of pasture (mixed of grass-legume vs. oat), herbage mass type (pre-grazing vs. post-grazing) and cow's genotype (Jersey, JY vs. crosses of Holstein with Jersey, HJ) on the IAP and cow productivity. The forages and the ruminal liquor of each animal and genotype were incubated during 24 hours to get the daily dry matter digested (dDMD) and the *in vitro* CO₂ and CH₄ + minor gases volumes from which were calculated the IAPs specific for CH₄, CO₂ (ICH₄, CO₂) and total (IAPT) per day and related to milk production (ML), protein (PROT) and milk fat (FAT). The pasture had effect ($p < 0.05$: oat > mixed) on the daily ICH₄ (184.5 vs 551.1, s.e.d=54), ICO₂ (717.4 vs 399.0, s.e.d=55), IAPT (16230 vs 5564, s.e.d=1464) and all the IAPs related to yield ($p < 0.05$). Herbage mass type (2.948 vs. 2.727, s.e.d=52.6 for pre and post-grazing) and genotype (2.990 vs 2.685, s.e.d=52.6 for JY>HJ) effected dDMD. Differences in body weight, ML and estimated dry matter intake were not observed between genotypes, however, the content of FAT (5.49 vs 4.80, s.e.d=0.14) and PROT (3.79 vs 3.62, s.e.d=0.05) was higher ($p < 0.05$) for HJ compared to JY. In conclusion, the pasture type had consistent effects on daily IAPs and its relation to productivity. Herbage mass type and genotype effected digestibility, while genotype effected milk fat and protein, without significant interactions of these effects on variables studied.

Key words: emissions; *in vitro*; index; GHG; AEI.

3.1.3 Introduction

Animal agriculture represents one of the anthropogenic activities with the largest impact on the environment including the air, water resources, soil and biodiversity. This activity accounts for up to 80% of global agricultural emissions (GLEAM-FAO, 2014), mainly in the form of CO₂ and CH₄ from enteric fermentation of ruminants and NO₂ from manure and nitrogen fertilization. These gases, have high *GWP (global warming potential)*, indicating the amount of heat that will retain 1 ton of the gas in question compared to 1 ton of CO₂ at 100 years. Current reports indicate that a ton of CH₄ amounts 28 to 36 ton of CO₂, and a ton of N₂O about 265 to 298 of CO₂ (EPA, 2014).

Another criticism is that, compared to other foods, livestock products have greater ecological footprint. For instance, the dairy sector would generate 2.7 to 4% of total emissions along the production chain (FAO, 2010) with carbon footprint of 0.8 to 3 kg eCO₂ kg of product⁻¹ (Hagemann *et al.*, 2011). Despite this, given the increasing global demand for food, the animal production meet the challenges of reducing emissions per unit of product or surface, being precisely its “trade-off” the productive intensification (Battini *et al.*, 2015).

Four main methodologies exist for the assessing environmental impact (AEI) of livestock systems: LCA (*Life Cycle Assessment*), ecological footprint, EMA (*Environmental Management for Agriculture*) and IOAS (*Input-Output Accounting Systems*); being the latter methodology the only one that also considers the sequestration or energy balance in the system.

The AEI, through indicators, enables the environmental management of livestock systems. Thus, the aim of this research was to propose indexes of atmospheric pollution derived from the *in vitro* fermentation at 24 hours of feedstuffs that can be utilized as environmental indicators on livestock systems.

3.1.3 Materials and methods

3.1.3.1 Location

The work was developed during January of 2015 at the organic milk production module at Universidad Autónoma Chapingo, Mexico, where forage samples were collected from the two pastures: mixed of grasses-legume (with 69.33% of *Medicago sativa* cv. *valenciana*, in week 1 of sampling) and oat (with 94.80% of *Avena sativa* var. Turquesa, in week 2) in which purebred Jersey dairy cows (JY) and their crosses with Holstein (HJ) were strip-grazed.

3.1.3.2 Experimental units

Three cows JY (JY1-JY3) and three HJ (HJ1-HJ3) were randomized to ruminal liquor extraction and sampling of milk. The characterization of the animals is shown in Table 5.

The ruminal liquor extraction was carried out in the first hour of the day (7 AM) by esophageal catheterization using a vacuum system. Animals were previously relaxed applying *alpha-2 adrenergic agonist* (*xylazine* a minimum dose of 0.2 mg.kg body weight⁻¹). Then, the ruminal liquor was transported in about one hour at the laboratory, filtered with 8 layers of gauze before being added to the inoculum, to avoid infiltration of forage particles in the bottles.

The dairy cows' productivity was measured considering average values of milk production (MP, kg) and percentage variables: protein (PROT) and milk fat (FAT), coinciding with 3 consecutive days of sampling of the pastures.

The percentages of fat and protein were obtained from composite samples taken from the two daily milkings using a MilkoScan FT120 (FOSS, Denmark). The results of these traits are presented in Table 6.

3.1.3.3 *In vitro* incubation and determination of digestibility and GHG emission

For the *in vitro* fermentation at 24 hours, 100 ml of ruminal liquor from the three experimental units was obtained and separately managed per genotype. Following the general recommendations described by Theodorou *et al.* (1994), using dark amber glass bottles containing 0.25 g of dry matter (DM) initial with 45 mL of ruminal inoculum containing 9 parts of reduced mineral solution (obtained adding 750 mL per liter of distilled water to 50 mL of Na₂CO₃ solution (8% w/v), 75 mL of type I mineral solution (SMI), 75 mL of type II mineral solution (SMII) and 2 drops of resazurine as the redox indicator) and one part of the ruminal fluid obtained, for incubation in water bath at 39°C.

The sodium carbonate solution (8%) contained 8.0 g of Na₂CO₃ dissolved in 100 mL of distilled water, the SMI 6.0 g of K₂HPO₄ (dibasic potassium phosphate) in 1000 mL of distilled water; the SMII 6.0 g of monobasic potassium phosphate (KH₂PO₄), 6.0 g of ammonium sulfate ((NH₄)₂SO₄), 12.0 g of sodium chloride (NaCl), 2.45 g of magnesium sulphate (MgSO₄) and 1.6 g of calcium chloride (CaCl₂) dissolved in 1000 mL of distilled water and reducing solution (SR) cysteine-sulfite with 2.5 g of L-cysteine in 15 mL of sodium hydroxide (NaOH) 2N, added to 50 mL of distilled water, 2.5 g of sodium sulfide (Na₂SO₄) and 2 drops of resazurine (1% w /v).

After measuring the total volumes of gas produced (ml) at 6, 12, 18 and 24 hours using glass syringes of 20 ml in the same individual volumes of gas in each flask, they were poured glass bottles containing 40 ml of 2N KOH solution, precipitating potassium salts after reaction with CO₂ of the samples, to shed as waste gas volumes corresponding to CH₄ and other minor gases (mainly H₂, SH₂). The final volumes of gas corresponding to the CO₂ (VCO₂) were obtained by difference between total (TV24) and residual volumes (RV24) obtained.

The dry matter (DM) remnant in the bottles was taken for the *in vitro* dry matter digestibility at 24 hours (IVDMD₂₄, %) calculated by gravimetric differences with

the initial DM, and the IVDMD₂₄ and GHG volume emitted were then used to calculate the IAPs.

3.1.3.4 Calculation of indexes of atmospheric pollution (IAPs) and linkage with cow productivity

The IAPs calculated from data of GHG *in vitro* emission were the following:

Index of specific atmospheric pollution by CH₄, (ICH₄) = ml of RV24.g of dDM₂₄⁻¹, where residual volume RV24=CH₄+lower gases volumes and digested dry matter at 24 hours (dDM₂₄, g)=eDMI. %IVDMD₂₄.

Index of specific atmospheric pollution by CO₂, (ICO₂) =ml of VCO₂.g of dDM₂₄⁻¹.

Index of atmospheric pollution total, (IAPT) =ml of ((RV24 x 28) + VCO₂).g of dDM₂₄⁻¹, where the number 28 multiplying to RV24 is equivalent to the GWP of the CH₄ at 100 years.

The eDMI was calculated relationing the animals body weight (BW) with forage yield (Ton) of the pastures assigned, which it was equivalent to 2.06% of the BW (kg) with diet based exclusively in grazing during the dry season of the year.

The IAPs in terms of liters per day summarized in the table 7, were obtained for each animal relationing the eDMI with the dDM₂₄. For example for eDMI = 9.59 kg and dDM₂₄ = (0.157 g/ 0.5g), DM digested per day was 3.011 Kg what in proportion to Index of atmospheric pollution general (IAPG) = 414.01ml.g dDM⁻¹ produce 1247 liters of gas per day, being IAPG=ml of TV24.g of dMD₂₄⁻¹.

The IAPs were related to the productive traits: MP, PROT and FAT showing as example the following nomenclature: IAPCH_{4MP} representing the CH₄ kg produced.kg of milk yield⁻¹.

The IAPs related to the productivity as produced kg of gases.kg of product are based on conversions of density gas considering $\mu\text{CO}_2=0.1842 \text{ kg.m}^3^{-1}$ and

$\mu\text{CH}_4=0.698$, 70% of CO_2 and 30% of CH_4 for the calculation of IAPT under similar proportions as those of the gases produced in the rumen.

3.1.5 Statistical analyses

In total there were 216 records from the bottles incubated by the pastures weekly sampled with equal number of observations for pre-grazing and post-grazing herbage mass. The pre-grazing and post-grazing herbage mass of three random block was cut, and, within block, pasture samples were randomly allocated to the rumen liquor collected from three *JY* or three *HJ* cows. The following mixed effects linear model with significant first order interactions was fitted to the experimental data using the MIXED procedure of SAS:

$$y_{ijklmn} = \mu + p_i + h_j + b_k + g_l + animal_m + e_{ijklmn}$$

Where:

y_{ijklmn} is every single value of the response variables (DMDD, IAPCH₄...);

p_i is the fixed effect of pasture sampled ($i = 1, \dots, 6$);

h_j is the fixed effect of herbage mass type ($j = \text{pre-grazing, post-grazing}$) $\sim \text{n.i.i.d.}(0, \sigma_j^2)$;;

b_k is the random effect of sampling block ($k = 1, \dots, 18$) $\sim \text{n.i.i.d.}(0, \sigma_q^2)$;

g_l is the fixed effect of cow genotype ($l = \text{Jersey, Holstein x Jersey}$);

$animal_m$ is the random effect of cow ($m = 1, \dots, 6$) $\sim \text{n.i.i.d.}(0, \sigma_{animal}^2)$;

A default variance components structure was specified for the estimation of the random effects. The option DDFM = SATTERTH was specified in the model statement to calculate approximate denominator degrees of freedom for those factors in the model without exact proof, according to the Satterthwaite criterion. Least square means were estimated for the fixed effects and

significance tests were calculated from the type 3 tests of fixed effects generated by the MIXED procedure. The options DIFF and ADJFE = ROW were specified in the LSMEANS statement to perform the multiple tests of the least square means.

3.1.6 Results and discussion

The JY and HJ dairy cows were on average 3.78 years old, in initial and middle lactation with different reproductive status (Table 5). No differences in body weight (BW, 366.0 kg JY vs 369.3 kg HJ, *s.e.d*=43), milk production (MP, 12.0 kg JY vs 12.3 HJ, *s.e.d*=0.83) and eDMI (9.55 kg JY vs 9.63 kg HJ, *s.e.d*=1.12) between genotypes were found.

The eDMI of this study was uniform as was calculated in grazing by default as a constant according to the animal's BW that did not differ by genotype. The MP also differed between genotypes being probably limited by the low forage available during the dry period of the year, although to be expected as part of the variability that animals more efficient have higher consumption per liveweight kg, partitioning more energy for maintenance and production (Allen, 2013; Arndt *et al.*, 2015). However, Coleman *et al.* (2010) quantifying effects of selection by the economic breeding index, suggesting that the best definition of feed efficiency (FE) would be associated with higher amounts of milksolids to similar levels of feed intake for the animals, without excessive mobilization of body tissue and maintaining good reproductive performance

Table 5. Experimental units characterization.

Animal	Age (years)	BW (kg)	MP (kg)	State of lactation	Reproductive status	eDMI (Kg)
JY1	2.66	368	14.6	I	RI	9.59
JY2	4.08	275	11.4	M	RI	7.17
JY3	6.08	455	11.0	I	RC	11.8
HY1	3.66	422	11.6	I	RC	11.0
HY2	2.42	313	12.6	I	RI	8.16
HY3	3.78	373	11.8	M	MG	9.72

I=initial, *M*=middle, *RI*=recently inseminated, *RC*=recently calving, *MG*=midgestation.

Table 6. Least square means of milk production traits by pasture and genotype (standard error of the different).

Milk traits	Levels Effect			
	Pasture		Cows genotype	
	Mixed	Oat	Jersey	Cross
Protein (%)	3.71 (0.05)	3.70 (0.05)	3.62 ^b (0.05)	3.79 ^a (0.05)
Lactose (%)	4.59 ^b (0.04)	4.80 ^a (0.04)	4.85 ^a (0.04)	4.54 ^b (0.04)
Urea (%)	6.59 ^b (0.16)	9.16 ^a (0.16)	8.77 ^a (0.49)	6.98 ^b (0.49)
Fat (%)	5.37 (0.18)	5.03 (0.18)	4.80 ^b (0.14)	5.49 ^a (0.14)
TMS (%)	14.28 (0.18)	14.48 (0.18)	14.01 (0.18)	14.75 (0.18)

Different literals in columns of same row of the section indicated significant difference by Tukey test ($p < 0.05$).

The composition traits covering in this study (protein, fat) were different and higher by *HJ* genotypes (protein 3.62 vs. 3.69, s.e.d.=0.05 and fat 4.80 vs. 5.49, s.e.d=0.14) constituting indicators of milk production efficiency per unit of DMI (Lopez-Villalobos *et al.*, 2008). However, by *JY*>*HJ* the dairy cows genotype showed effect on the level of lactose (4.85 vs. 4.54, s.e.d=0.04) and urea (8.77 vs. 6.98, s.e.d=0.49), likewise that the pasture by oat that the mixed pasture, being oat>mixed for the lactose (4.80 vs. 4.59, s.e.d=0.04) and urea (9.16 vs. 6.59, s.e.d=0.16) respectively.

Although no differences for MP in this case, the lactose is a disaccharide which by their osmotic effect in the mammary gland increases the milk volume produced, presenting negative correlation with the TMS (-0.35) being of importance for indicators of the dairy industry as the protein-protein ratio plus to lactose, motivating intention of genetic selection thereon (Sneddon *et al.*, 2012, Sneddon *et al.*, 2014).

Otherwise the urea is an indicator of nitrogen use efficiency for milk production (milk N / N in feed intake) varying from 10 to 25% in dairy cows (Powel *et al.*,

2013), and while the N losses as N₂O from manure would be as low as 1% (Bai *et al.*, 2014), should not underestimate this source of GHG.

Low values of DDMD (table 7) correspond to low values of the eDMI, despite the %IVDMD₂₄ was adequate and higher for JY about HJ (62.5 vs. 55.7 s.e.d=0.61, $p<0.0001$). Nonetheless, the DDMD was higher by JY genotype (2.990 vs. 2.685, s.e.d=52.6) that HJ and by pre-grazing herbage mass (2.948 vs. 2.727, s.e.d=52.6) that post-grazing respectively.

Results of ICH₄ by pasture, herbage mass type and genotype are close to the Berra report (2009) with up to 1180 liters of gas and 359 liters of CH₄ produced daily by a Holstein dairy cows of 550 kg liveweight. Values of ICH₄d in oat pasture were 33.2% higher than in the mixed pasture (184.5 vs. 555.1, s.e.d=54), which at the same eDMI level may be related to the forage digestibility, greater availability of rapidly fermentable carbohydrates in the oat pasture.

While large variations between- and within animal are observed in the CH₄ outputs regardless of regime, feedstuff type or measurement technique, the dry matter intake (DMI) is highlighted by most authors as the most influential variable on the ruminal methanogenesis, which it tends to decrease when feeding is decreased above the level of the maintenance requirements (Blaxter and Clapperton, 1965) and increase in undernourishment (Montenegro and Abarca, 2000). Thereby, for production of 23 g CH₄. kg DMI⁻¹ proposed by Dijkstra *et al.* (2011), estimates in relation to daily consumption were 128.8 and 387.4 g CH₄ DDMD⁻¹ in the mixed and oat pasture respectively, being less the value obtained in the mixed pasture compared with those reported by Garnsworthy *et al.* (1012) who calculated variation range of 278 to 456 g of CH₄ issued per day or with Boucek *et al.* (2014) with 151 to 497 g day⁻¹.

Boucek *et al.* (2014) also highlights higher emissions of Holstein Friesian (299 g day⁻¹) compared to their crossbred (264 g day⁻¹), although other authors

as Carberry *et al.* (2014) indicate that the abundance of methanogens not differ by genotype.

In a compilation of Boadi *et al.* (2004) about MP and CH₄ emissions that was measured by several techniques, it shows that for the MP range considered (22 to 41.3 kg day⁻¹) to greater productivity the ranges of CH₄ production per animal and unit product is reduced (623 vs. 470 L CH₄ animal day⁻¹ and 28.3 vs 11.4 L CH₄ milk kg⁻¹) respectively. The higher values of these ranges were by the SF₆ tracer technique with inner tubes permeation and the lower respiratory chambers, noting also great variability by both indicators of CH₄ emission according to the methods of measuring used.

In recent simulations of CH₄ emissions by the climatic regions of México, Castelán-Ortega *et al.* (2014) proposed models of alternative use to the prediction equations by default from the Tier I of the IPCC, with estimation of 283 g CH₄ head day⁻¹ by diet based on mixed forage (*Pennisetum clandestinum*, *Sporobolus indicus*, *Eleocharis dombeyana*, *Trifolium amabile*) in temperate regions and 319 g CH₄ head day⁻¹ by tropical regions based on use of *Cynodon spp*, emphasizing the importance of these low quality forages make up most of the diet for the 86% of the Mexican cattle.

Deem $\mu\text{CH}_4 = 0.698 \text{ kg.m}^{-3-1}$ under normal conditions of temperature (25°C) and atmospheric pressure (101.3 kPa) while the yields of CH₄ expressed as g day⁻¹ seem outliers, this may be related to sensitivity and lower forage yields of temperate crops as the alfalfa (predominant in the mixed pasture) during drought.

The ICO_{2d} were only major for oat that the mixed pasture (717.4 vs 399.0, s.e.d=55). Regarding to the total volume of gas produced (VT₂₄) in relation to eDMI per day by pasture, the IAP_{CO_{2d}} was 69% by the mixed pasture and the 56% by oat pasture, taking like reference proportion of 65-70% of CO₂ and 27% of CH₄ from ruminal fermentation indicated by Ku Vera *et al.* (2012). Therefore,

a higher ICO2d corresponds to higher proportion of CO₂ and lower CH₄ proportion according to the TV24 produced and vice versa.

The IAPT_d in kg equivalent of CO₂ (eCO₂) considering GWP of CH₄ was just different and higher by oat than mixed pasture (16263 vs 5564, s.e.d=1464).

Table 7. Estimation of daily digested dry matter (DDMd, kg) and indexes of atmospheric pollution (IAPs) (liters per day⁻¹) according to pasture, herbage mass type (Pre-Post-g) and genotype (standard error of the different).

Model	Pasture		Levels Effect		Dairy cow genotype	
	Mixed	Oat	Pre-g	Post-g	Jersey	Cross
DDMd	2.838 (52.6)	2.836 (52.6)	2.948 ^a (52.6)	2.727 ^b (52.6)	2.990 ^a (52.6)	2.685 ^b (52.6)
ICH _{4d}	184.5 ^b (54.0)	555.1 ^a (54.0)	418.7 (54.0)	320.9 (54.0)	318.6 (54.0)	420.9 (54.0)
ICO _{2d}	399.0 ^b (55.0)	717.4 ^a (55.0)	563.5 (55.0)	552.9 (55.0)	570.7 (55.0)	545.7 (55.0)
IAPT _d	5564 ^b (1464)	16263 ^a (1464)	12289 (1464)	9537 (1464)	9494 (1464)	12333 (1464)

Different literals in columns of same row of the section indicated significant difference by Tukey test ($p < 0.05$).

In the table 8 are observed the significance levels for random effects: block and animal included in the models of IAPs related a productive traits, being significant not the random effect of block or animal for the models.

Table 8. Estimated variance components for the random effects of models of index atmospheric pollutions (IAPs) related to milk production (MP), protein (PROT) and FAT using ruminal liquor of *JY* or *HJ* cows

Effect	Estimated variance	SE	Z Value	Pr > Z
Model ICH4 _{MP}				
Block	0.000010	0.000041	0.25	0.4024
Animal	0.000051	0.000060	0.85	0.1980
Residual	0.001209	0.000124	9.77	<.0001
Model ICH4 _{PROT}				
Block	0.007727	0.024340	0.32	0.3754
Animal	0.021780	0.029370	0.74	0.2291
Residual	0.707600	0.072410	9.77	<.0001
Model ICH4 _{FAT}				
Block	0.004039	0.013110	0.31	0.3790
Animal	0.016990	0.019560	0.87	0.1925
Residual	0.38260	0.039150	9.77	<.0001
Model ICO2 _{MP}				
Block	5.247E-6	0.000290	0.02	0.4928
Animal	0.000248	0.000361	0.69	0.2459
Residual	0.009384	0.000960	9.77	<.0001
Model ICO2 _{PROT}				
Block	0.010070	0.17640	0.06	0.4772
Animal	0.120500	0.19670	0.61	0.2700
Residual	5.639400	0.57710	9.77	<.0001
Model ICO2 _{FAT}				
Block	0.006325	0.09288	0.07	0.4729
Animal	0.127600	0.14860	0.86	0.1952
Residual	2.958000	0.30270	9.77	<.0001
Model IAPT _{MP}				
Block	0.006979	0.02646	0.26	0.3960
Animal	0.049950	0.05079	0.98	0.1627
Residual	0.785100	0.08033	9.77	<.0001
Model IAPT _{PROT}				
Block	5.783900	15.9676	0.36	0.3586
Animal	22.16900	24.6709	0.90	0.1844
Residual	456.2200	46.6843	9.77	<.0001
Model IAPT _{FAT}				
Block	2.981600	8.59310	0.35	0.3643
Animal	17.10990	16.9643	1.01	0.1566
Residual	246.9900	25.2738	9.77	<.0001

In the Table 9 to 11 can be corroborated the levels of significance or probability of error for the type 3 test from fixed effects: pasture, herbage mass type and dairy cow's genotype fitted to the different model.

Table 9. Levels of significance (probability) for the type 3 tests of the fixed effects fitted to the models of index air pollutions for CH₄ (CH₄) related to milk production (MP), protein (PROT) and FAT of JY or HJ cows.

Model	Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
ICH ₄ _{MP}	Pasture	1	16	17.8	0.0006
	Herbage mass type	1	192	1.57	0.2121
	Cow genotype	1	4	0.78	0.4273
ICH ₄ _{PROT}	Pasture	1	16	21.4	0.0003
	Herbage mass type	1	192	1.69	0.2110
	Cow genotype	1	4	0.88	0.4023
ICH ₄ _{FAT}	Pasture	1	16	22.2	0.0002
	Herbage mass type	1	191	1.69	0.1951
	Cow genotype	1	4	0.25	0.6456

Different literals in columns of same row of the section indicated significant difference by Tukey test ($p < 0.05$).

Table 10. Levels of significance (probability) for the type 3 tests of the fixed effects fitted to the models of index air pollutions for CO₂ (CO₂) related to milk production (MP), protein (PROT) and FAT of JY or JY cows.

Model	Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
ICO ₂ _{MP}	Pasture	1	33	12.8	0.0011
	Herbage mass type	1	33	0	0.9676
	Cow genotype	1	4	0.04	0.8602
ICO ₂ _{PROT}	Pasture	1	33	16.2	0.0003
	Herbage mass type	1	33	0.02	0.8951
	Cow genotype	1	4	0.06	0.8191
ICO ₂ _{FAT}	Pasture	1	33	12.9	0.0001
	Herbage mass type	1	33	0.01	0.9181
	Cow genotype	1	4	0.67	0.46

Different literals in columns of same row of the section indicated significant difference by Tukey test ($p < 0.05$).

Table 11. Level of significance (probability) for the type 3 tests of the fixed effects fitted to the models of index air pollutions total (IAPT) related to milk production (MP), protein (PROT) and FAT of *JY* or *HJ* cows.

Model	Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
IAPT _{MP}	Pasture	1	16	25.04	0.0001
	Herbage mass type	1	191	1.9	0.1693
	Cow genotype	1	4	0.69	0.4528
IAPT _{PROT}	Pasture	1	16	30.12	<.0001
	Herbage mass type	1	17	2.09	0.1666
	Cow genotype	1	4	0.78	0.4276
IAPT _{FAT}	Pasture	1	16	25.06	0.0001
	Herbage mass type	1	191	1.9	0.1694
	Cow genotype	1	4	0.69	0.4528

Different literals in columns of same row of the section indicated significant difference by Tukey test ($p < 0.05$).

In the table 12 can be seen that only the pasture had effect on all the IAPs: ICH₄, ICO₂ and IAPT related to traits of milk production: MP, PROT, FAT, being higher for the oat than mixed pasture in all the cases ($p < 0.05$).

Table 12. Least square means for the significant fixed in the models of GHG emission and index air pollutions (IAP) of pasture samples digested by rumen liquor of *JY* or *HJ* (standard error of the different).

Model	Levels Effect					
	Pasture		Herbage mass		Cows genotype	
	Mixed	Oat	Pre-grazing	Post-grazing	Jersey	Cross
ICH4 _{MP}	0.01 ^b (4E-3)	0.03 ^a (4E-3)	0.02 (4E-3)	0.01 (4E-3)	0.01 (5E-3)	0.02 (5E-3)
ICH4 _{PROT}	0.28 ^b (1E-1)	0.84 ^a (1E-1)	0.64 (1E-1)	0.49 (1E-1)	0.64 (1.2E-1)	0.48 (1.2E-1)
ICH4 _{FAT}	0.19 ^b (8E-2)	0.62 ^a (8E-2)	0.46 (8E-2)	0.35 (8E-2)	0.37 (9E-2)	0.44 (9E-2)
ICO2 _{MP}	0.06 ^b (1.1E-2)	0.11 ^a (1.1E-2)	0.09 (1.1E-2)	0.08 (1.1E-2)	0.09 (1.3E-2)	0.08 (1.3E-2)
ICO2 _{PROT}	1.78 ^b (2.8E-2)	3.01 ^a (2.8E-2)	2.36 (2.8E-2)	2.32 (2.8E-2)	2.39 (3E-1)	2.29 (E-1)
ICO2 _{FAT}	1.14 ^b (2.2E-1)	2.19 ^a (2.2E-1)	1.68 (2.2E-1)	1.65 (2.2E-1)	1.83 (2.6E-1)	1.51 (2.6E-1)
IAPT _{MP}	0.99 ^b (1.3E-2)	1.35 ^a (1.3E-2)	0.75 (1.3E-2)	0.58 (1.3E-2)	0.76 (1.6E-2)	0.58 (1.6E-2)
IAPT _{PROT}	9.53 ^b (2.93)	26.6 ^a (2.93)	20.2 (2.87)	15.9 (2.87)	15.9 (3.46)	20.2 (3.46)
IAPT _{FAT}	6.56 ^b (2.34)	19.4 ^a (2.34)	14.5 (2.30)	11.4 (2.30)	12.2 (2.86)	13.8 (2.86)

Different literals in columns of same row of the section indicated significant difference by Tukey test ($p < 0.05$).

The IAPs related to MP were even higher by the oat than mixed pasture. The IAPT equivalent to the carbon footprint (CF) was practical being the environment indicator most referenced by other authors in the productive systems. The IAPT_{MP} was 0.99 and 1.35 kg eCO₂.Kg of milk production⁻¹ (± 0.013) for mixed and oat pasture respectively, agreeing with reports from different latitudes as 0.99 $\pm$ 0.10kg eCO₂.fat and protein milk corrected (FPMC) in Uruguay (Lizarralde *et al.*, 2014) or 1.1 $\pm$ 0.15Kg eCO₂.Kg FPMC⁻¹ in Ireland (O'Brien *et al.*, 2014).

Studies comparing the effect of the system productive on GHG emission point lower CF for intensive systems such as the feedlot, and similar emissions in semi-intensive or extensive grazing systems (Ruviaro *et al.*, 2015). Precisely Batalla *et al.* (2015) distinguishing the importance of pasture as carbon (C) sinks, found CF of 2 to 5.2 kg CO₂. Kg FPMC⁻¹ from sheep grazing before considering the effect of the C balance in the system, after which no differences were observed in the CF by breeds or production systems.

Minor CF per unit of output is expected with intensification, however you should consider dynamic load and pollution potential nitrogenous by surface in animals with higher genetic merit for milk production (Chagunda *et al.*, 2009), take integrated approach of milk and meat production by changes in land use (Flysjö *et al.*, 2012) and combine the profitability and low emissions as evidence O'Brien *et al.* (2010).

Impacts of intensification were also investigated comparing organic and conventional production systems. Thomassen *et al.* (2008) reported that conventional production systems had lower CH₄ emissions. Kg of product⁻¹ respect to organic systems, in contrast to Haas *et al.* (2001) who found no differences between intensive systems of organic and conventional production, while Basset - Mens *et al.* (2009) reported increased intensity of production (yield.Ha⁻¹) concomitant to increased emissions per kg of product in New Zealand where it has been reported up to 90% of milk production under these referenced as the most cost-efficient systems (Dillon, 2006), contributing to 31.8% of total GHG emitted in that country (knight *et al.*, 2007).

3.1.7 Conclusions

The quantification of CO₂ and CH₄ and proposition of practical indexes of air pollution can be a useful tool for the assessing environmental impact (AEI) and development of environmental management strategies as the selection of efficient animal genotypes by digestibility, milk solids production and the use of temperate mixed grasslands by lower IAPs ($p < 0.05$) in such systems.

Of the proposed IAPs, the IAPT equivalent to the carbon footprint was the more comparable in referent to other studies, while the else ICH₄ and ICO₂ are innovative.

3.1.8 References

- Allen, M. S. 2013. Effects of neutral detergent fiber concentration and digestion characteristics on energy intake and partitioning of lactating cows. *Journal of Animal Science* 91(E-Suppl. 2): 114-122.
- Arndt, C, J. M. Powell, M. J. Aguerre, P. M. Crump and M. A. Wattiaux. 2015. Feed conversion efficiency in dairy cows: Repeatability, variation in digestion and metabolism of energy and nitrogen, and ruminal methanogens. *Journal of Dairy Science* 98: 3938–3950.
- Berra, G., L. Finster y S. Valtorta. 2009. Una técnica sencilla para la medición de emisiones de metano entérico en vacas. *FAV Ciencias Veterinarias* 8 (1). P. 9.
- Bai, Z., L. Ma, O. Oenema, Q. Chen and F. S. Zhang. 2014. Nitrogen and phosphorus use efficiencies in dairy production in China. *Journal of Environmental Quality* 42: 990-1001.
- Batalla, I., M. Knudsen, L. Mogensen, O. Del Hierro, M. Pinto and J. Hermansen. 2015. Carbon footprint of milk from sheep farming systems in Northern Spain including soil carbon sequestration in grasslands. *Journal of Cleaner Production* 104: 121–129.
- Basset-Mens, C., S. Ledgard and M. Boyes. 2009. Eco-efficiency of intensification scenarios for milk production in New Zealand. *Ecological Economics* 68: 1615-1625.
- Battini, F., A. Agostini, V. Tabaglio and S. Amaducci. 2015. Environmental impacts of different dairy farming systems in the Po Valley. *Journal of Cleaner Production*. In press, doi:10.1016/j.jclepro.2015.09.062.
- Blaxter K. L. and J. L. Clapperton. 1965. Prediction of the amount of methane produced by ruminants. *British Journal Nutritional* 19: 511-522.
- Boadi D., C. Benchaar, J. Chiquette et D. Massé. 2004. Stratégies visant à réduire les dégagements de méthane entérique des vaches laitières: bilan. *Canadian Journal of Animal Science* 84: 319–335.
- Broucek, J. 2014. Production of Methane Emissions from Ruminant Husbandry: A Review. *Journal of Environmental Protection* 5: 1482-1493.
- Chagunda, M. G., D. A. Romer and D. J. Romer. 2009. Effect of genotype and feeding regime on enteric methane, non-milk nitrogen and performance dairy cows during the winter feeding period. *Livestock Science* 122: 323-332.
- Carberry C., S. Watersa, D. Kenya and C. Creeveya. 2014. Rumen methanogenic genotypes differ in abundance according to host residual feed intake phenotype and diet type. *Applied Environmental Microbiology* 80: 586-594.

- Castelán-Ortega, O. A., J. C. Ku-Vera, J. G., Estrada-Flores 2014. Modeling methane emissions and methane inventories for cattle production systems in México. *Atmósfera* 27: 185-191.
- Coleman, J., Pierce, K. M.; Berry, D. P.; Brennan, A.; Horan, B. 2010. Increasing milk solids production across lactation through genetic selection and intensive pasture-based feed system. *Journal of Dairy Science* 93:4302–4317.
- Dijkstra, J. S., M. Van Zijderveld, J. A. Apajalahti, A. Bannink, W. J. J. Gerrits, J.R. Newbold, H. Perdok and H. Berends. 2011. Relationships between methane production and milk fatty acid profiles in dairy cattle. *Animal Feed Science and Technology* 166: 590–595.
- Dillon, P. 2006. Achieving high dry matter intake from pasture with dairy cows. *Fresh herbage for dairy cattle*. Springer.Houten. The Netherlands: 1-26.
- EPA. 2014. Methane and nitrous oxide emissions from natural sources. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, USA. Available in: <http://www3.epa.gov/climatechange/ghgemissions/gases/ch4.htm>. Accessed January 20, 2015.
- Hagemann, M., T. Hemme, A. Ndambi, O. Alqaisi, Sultana and M. Nadira. 2011. Benchmarking of greenhouse gas emissions of bovine milk production systems for 38 countries. *Animal Feed Science and Technology* 116: 46-58.
- Hass G., F. Wetterich, U. Kopke. 2001. Comparative intensive, extensified and organic grassland farming in southern Germany by process life cycle assessment. *Agriculture, Ecosystem and Environmental* 83: 43-53.
- FAO (Food and Agriculture Organization). 2010. Gas emissions from the dairy sector. A life cycle assessment. Rome, Italy. P. 94.
- Flysjö, A., C. Cederberg, M. Henriksson and S. Ledgard. 2012. The interaction between milk and beef production and emissions from land use change – critical considerations in life cycle assessment and carbon footprint studies of milk. *Journal of Cleaner Production* 28: 134-142.
- Garnsworthy P., J. Craigon, J. Hernandez-Medrano and N. Saunders. 2012. On-farm methane measurements during milking correlate with total methane production by individual dairy cows. *Journal of Dairy Science* 95: 3166–3180.
- GLEAM-FAO (Global Livestock Environmental Assessment Model-Food and agriculture Organization of the United Nations). 2014. Available in: http://www.fao.org/ag/againfo/home/en/news_archive/2015_GLEAM_environmental_impacts.html. Accessed August 21, 2015.
- Knight, T. W., G. Molano, W. Nichols and H. Clark. 2007. Effect of feeding Caucasian clover, ryegrass and combinations of ryegrass and clovers on the methane emissions of wether lambs. In: *Greenhouse Gases and Animal Agriculture Conference*. New Zealand: LVI-LVII.
- Ku V., J. C., A. Ayala, C. Pérez, J. Camacho and O. Castelán. 2012. Emisiones de metano por rumiantes. *Ciencia y Tecnología* 4: 23-27.
- Lizarralde, C., V. Picasso, A. Rotz, M. Cadenazzi and L. Astigarraga. 2014. Practices to Reduce Milk Carbon Footprint on Grazing Dairy Farms in

- Southern Uruguay: Case Studies. *Sustainable Agriculture Research* 3: 1328-1333.
- Lopez-Villalobos, N., D. Berry, B. Horan, F. Buckley, J. Kennedy, M. O'Donovan, L. Shalloo and P. Dillon. 2008. Genetics of residual energy intake in Irish grazing dairy cows. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production* 68: 97–100.
- Montenegro J. y S. Abarca. 2000. Fijación de carbono, emisión de metano y de óxido nitroso en sistemas de producción bovina en Costa Rica. In: *Intensificación de la ganadería en Centroamérica: Beneficios económicos y ambientales*. CATIE – FAO – SIDE. Nuestra Tierra (ed.). P. 334.
- O'Brien, D., L. Shalloo, C. Grainger, F. Buckley, B. Horan and M. Wallace. 2010. The influence of strain of Holstein-Friesian cow and feeding system on greenhouse gas emissions from pastoral dairy farms. *Journal of Dairy Science* 7: 3390–3402.
- O'Brien, D., B. Padraig, H. James, R. Eimear and S. Laurence. 2014. An appraisal of carbon footprint of milk from commercial grass-based dairy farms in Ireland according to a certified life cycle assessment methodology. *The International Journal of Life Cycle Assessment* 19: 1469-1481.
- Powell, J., M. MacLeod, T. Vellinga, C. Opio, A. Falcucci, G. Tempio, H. Steinfeld and P. Gerber. 2013. Feed–milk–manure nitrogen relationships in global dairy production systems. *Livestock Science* 152: 261–272.
- Ruviaró, C., C. de Léis, V. do N. Lampert, J. Barcellos and H. Dewes. 2015. Carbon footprint in different beef production systems on a southern Brazilian farm: a case study. *Journal of Cleaner Production* 96: 435–443.
- Sneddon, N., N. Lopez-Villalobos, R. Hickson and L. Shalloo. 2013. Review of milk payment systems to identify the component value of lactose. In: *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production* 73: 33-36.
- Sneddon, N., Lopez-Villalobos, R., E. Hickson, L. Shalloo, D. J. Garrick and U. Geary. 2015. In: *Proceedings 10th World Congress of Genetics applied to livestock production prediction of industry production of milk components, yields of dairy products and lactose deficit under the current breeding objective of New Zealand dairy cattle*. P.15.
- Theodorou M. K., B. A. Williams, M. S. Dhanoa, A. B. McAllan and J. France. 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology* 48: 185-197.
- Thomassen M., K. Calke, M. Smits, G. Lepema and I. de Boer. 2008. Life cycle assessment of conventional and organic milk production in the Netherlands. *Agricultural Systems* 96: 95-107.

3.2 HIGHER *IN VITRO* DIGESTIBILITY OF FORAGE USING RUMINAL LIQUOR OF LACTATING JERSEY COMPARED TO THE HOLSTEIN X JERSEY CROSSBRED COWS

3.2.1 Resumen

Diferencias en la capacidad de digerir forrajes fibrosos entre genotipos de ganado bovino han sido documentadas, siendo importante entre razas *Bos taurus* y sus cruza para la ganadería de zonas templadas. Por otra parte, en qué medida estas diferencias en la digestión de la fibra se deben al inóculo ruminal no es bien conocida. El objetivo del estudio fue evaluar el efecto del uso de líquido ruminal de vacas lecheras *Jersey* de raza pura (*JY*) o mestizas *Holstein* × *Jersey* (*HJ*) sobre la digestibilidad *in vitro* de la materia seca a 24 horas (*DIVMS₂₄*) de la masa de forraje ofrecida y residual de un sistema de producción orgánico en pastoreo. Para la determinación de la *DIVMS₂₄* igual número de muestras de forraje pre y post-pastoreado de nueve cuadrantes al azar por pradera semanalmente muestreada: mixta de gramínea-leguminosa y otra predominante de avena, se recolectaron durante tres días consecutivos y asignaron al azar al líquido ruminal proveniente de tres vacas *JY* puras y tres mestizas *HJ*. Un modelo lineal mixto que incluyó los efectos fijos de día, tipo de masa de forraje, genotipo de vaca lechera y los efectos aleatorios del animal, cuadrante e interacciones fue utilizado. La *DIVMS₂₄* fue mayor para el forraje ofrecido que para el residual (61.4 vs. 56.8%; e.e.d=0.58; $p<0.0001$) y para las muestras digeridas por el líquido ruminal de vacas *JY* puras que para aquellas digeridas por líquido ruminal de vacas mestizas *HJ* (62.5 vs. 55.7%; e.e.d=0.61; $p<0.0001$). Además, con la interacción significativa de los días de muestreo y el genotipo sobre la *DIVMS₂₄* (64.2, 60.8% para *JY* y 54.0, 57.4% para *HJ* en pradera mixta y avena respectivamente, e.e.d=1.31, $p<0.0001$) se concluye mayor capacidad del genotipo *JY* para aprovechar las praderas existentes en el sistema de pastoreo.

Palabras claves: Vacas *Jersey*; *Holstein* × *Jersey*; *DIVMS*; pastoreo; masa forrajera.

3.2.2 Abstract

Differences in the ability to digest fibrous forages by different cattle genotypes have been documented with important differences between the *Bos taurus* breeds and their crosses for temperate animal agriculture. However, to what extent these differences in fiber digestion are due to differences in rumen inoculum is not well known. The objective of the study was to evaluate the effect of using rumen liquor of purebred Jersey (JY) or crossbred Holstein × Jersey (HJ) lactating cows on *in vitro* dry matter digestibility at 24 hours (IVDMD₂₄) of pre- and post-grazing herbage mass from an organic grazing dairy system. Pre- and post-grazing herbage samples were collected weekly, for three consecutive days, from 9 random quadrats from a grass-legume mixed paddock and from a predominantly oats paddock. Three cows of each genotype were used to determinate IVDMD₂₄; equal number of herbage samples were randomly assigned to rumen liquor from each genotype. A mixed effects linear model containing the fixed effects of day, herbage mass type, cow genotype and the random effects of animal, quadrat and interactions was fitted. Greater IVDMD₂₄ was observed for pre-grazing than for post-grazing herbage mass (61.4 vs. 56.8 %; s.e.d = 0.58; $p < 0.0001$) and for pasture samples inoculated in rumen liquor of purebred JY than for those inoculated with HJ rumen liquor (62.5 vs. 55.7 %; s.e.d = 0.61; $p < 0.0001$). Further, with the significant effect of the interaction day of sampling with genotype on IVDMD₂₄ (64.2 and 60.8% by JY, 54.0 and 57.4% by HJ in mixed and oat pasture respectively, s.e.d.=1.31, $p < 0.0001$) it is concluded that JY genotype has greater ability to take advantage of the available grasslands from grazing systems.

Key words: Jersey cows; Holstein x Jersey cows; IVDMD; grazing; herbage mass.

3.2.3 Introduction

Digestibility is considered an indicator of nutrient use efficiency and the productive performance of livestock. Improvements in digestibility benefit the environment because less digestible energy is lost as methane or purines (Reynolds *et al.*, 2011). From an animal science standpoint, there is a great deal of interest in improving fiber digestion in ruminants because a decreasing linear relationship was found between the proportion of forage included in the ration (0-90%) and reduction in production costs (0-25%, $R^2 = 0.78$) for most cattle producing countries (Dillon, 2006).

Interspecific differences in digestibility and use of fiber have been largely documented between *Bos taurus* and *Bos indicus*, and less frequently between dairy genotypes. It has been hypothesized that genetic selection for production has been detrimental to the climatic adaptation and the nutritional stress such as when animals consume tropical woody grasses of low quality (Van Soest, 1994); although *in vitro* NDF digestibility (IVNDFD) is considered by many authors as one of the most important indicators of forage quality for lactating cows.

Many studies have focused on determining the effects of forage quality on animal performance, but fewer have dealt with intrinsic animal factors as the possible effect or their interactions on production indicators such as digestibility or conversion efficiency. Genetic variations of 0.08 to 0.45 for *in vitro* digestibility (Berry *et al.*, 2007), behavioral influences (Prendiville *et al.*, 2011), and anatomical evidence of the digestive tract and probably rumen microbial population likely explain the differences in digestibility among animals of varying genetic merit for milk production or total solids such as *Holstein-Friesian* or *Jersey* versus their crosses (Beecher *et al.*, 2014).

When using the *in vitro* fermentation technique, the feedstuff and inoculum may have additive effects on fermentation in animals adapted to certain diets (Serment *et al.*, 2015) and in turn the ruminal pH of animals used as donors of inoculum have been identified as the main factor that influence microbial activity

(Bochi-Brum *et al.*, 1999). This is particularly especial for cellulolytic bacteria and it may affect the values of *in vitro* digestibility (Weiss, 1994), which remains as the most commonly used technique. It has also been shown that a closed correlation between the *in vivo* and *in situ* degradability techniques require higher costs and efforts (Tagliapietra *et al.*, 2012; Stalker *et al.*, 2014; Dixon and Coates, 2015). Given the previous evidence, this study aimed at comparing the *in vitro* digestibility of pre-grazing and post-grazing pasture using two genotypes of dairy cattle, namely pure bred Jersey (JY) and Holstein × Jersey (HJ) cows, grazing a grass-based or a mixed pasture.

3.2.4 Materials and methods

3.2.4.1 Sampling scheme, botanical composition and laboratory analyses

This experiment was conducted at the Organic Milk Production Module of the Experimental Farm of the Autonomous University of Chapingo. Pre- and post-grazing forage samples were obtained from random quadrats located in grazing strips measuring 100 × 15 m. Grazing strips were assigned daily to lactating dairy cows from each genotype. Pre- and post-grazing samples were collected from three quadrats of 1 m² that were randomly allocated to both extremes, and the center of the pastures. Samples were collected daily for three consecutive days during two weeks. There were two types of pasture: grass-legume mixed pasture with 69.33% of alfalfa (*Medicago sativa* cv. *valenciana* in week 1) and other with 94.8% of oat (*Avena sativa* var. *turquesa* in week 2) totaling 36 sampling quadrats. The sampling was done by manually clipping the forage at 5 cm from the ground.

A total of 108 samples (54 per week sampling) were characterized according to type of plant found in the quadrats. Pre-grazing samples were collected in plastic bags and manually separated into grasses, legumes and weeds. The residual forage post-grazing consisted mostly of non-discernible stubble.

Dry matter constant was determined (65 °C until constant weight) and analyzed following the methodology of the AOAC (1995) for obtaining the proximal chemical analysis, namely analytical dry matter (DM), ash, crude protein (CP), crude fiber (CF), ether extract (EE); and nitrogen free extract (NFE). Additionally, neutral and acid detergent fiber (NDF and ADF) were determined using the manual fiber digester (*Ankom Technology®* A200I, USA) following the method of Van Soest *et al.* (1991). Gross energy content (GE, Mcal. kg DM⁻¹) was obtained by combustion using a bomb calorimeter (Parr® model 1271, USA).

Table 13. Botanical composition of forage samples.

Component	Pre-grazing		Post-grazing	
	Mixed	Oat	Mixed	Oat
Grasses ¹				
Percentage	25.43			
DM, %	23.90			
Yield, Tn Ha ⁻¹	2.466			
Cereal crop ²				
Percentage		94.80		
DM, %		19.23		
Yield, Tn Ha ⁻¹		7.500		
Legume ³				
Percentage	69.30			
DM, %	21.86			
Yield, Tn Ha ⁻¹	5.300			
Weeds ^{4,5}				
Percentage	5.270	5.200		
DM, %	20.75	21.63		
Yield, Tn Ha ⁻¹	0.600	0.466		
Legume-grasses-weeds mixed				
Percentage	100.0			
DM, %	22.50			
Yield, Tn Ha ⁻¹	8.130			
Cereal crop-weeds mixed				
Percentage		100.0		
DM, %		19.66		
Yield, Tn Ha ⁻¹		7.966		
Stubble mixed				
Percentage			21.56	18.73
DM, %			24.86	20.56
Yield, Tn Ha ⁻¹			1.733	1.533

References: Grasses¹ (*Lolium multiflorum*, *Brachiaria decumbens*), Legume² (*Medicago sativa*) Cereal crop³ (*Avena sativa*), Weeds of mixed prairie⁴ = *Chenopodium* spp, *Wedelia glauca*, *Taraxacum officinale*, *Sida rhombifolia*; Weeds of oat prairie⁵ = *Chenopodium* spp, *Wedelia glauca*, *Taraxacum officinale*, *Coronopus didymus*, *Oxalis* spp . DM %: dry matter percentage; Percentage of type forage in pasture sampled regarding to mixture of offered forage (100%).

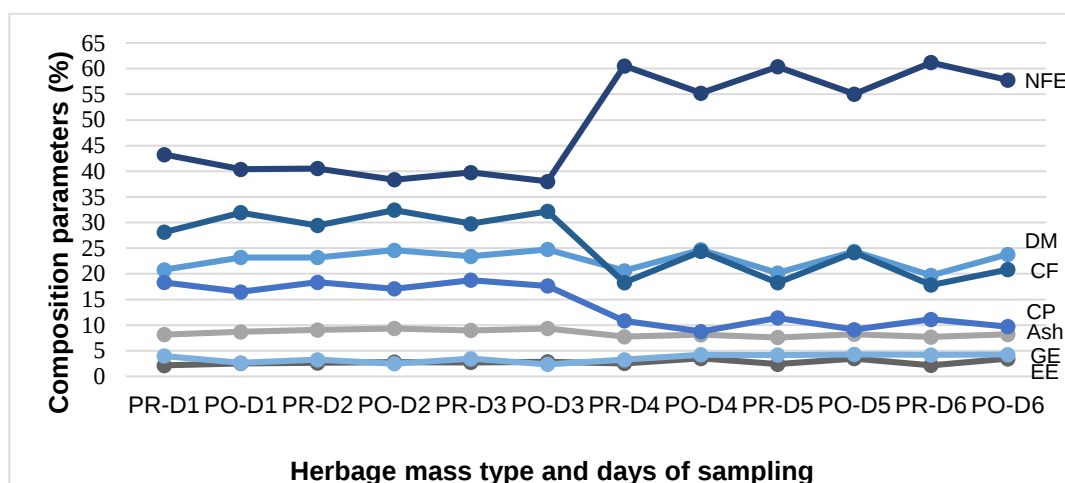


Figure 2. Proximate analysis and gross energy of composite samples of forage per herbage mass type (PR=pre-grazing, PO=post-grazing) and days of sampling (D1 to D3 in mixed pasture and D4 to D6 in oat pasture).

*Values in dry basis except the DM.

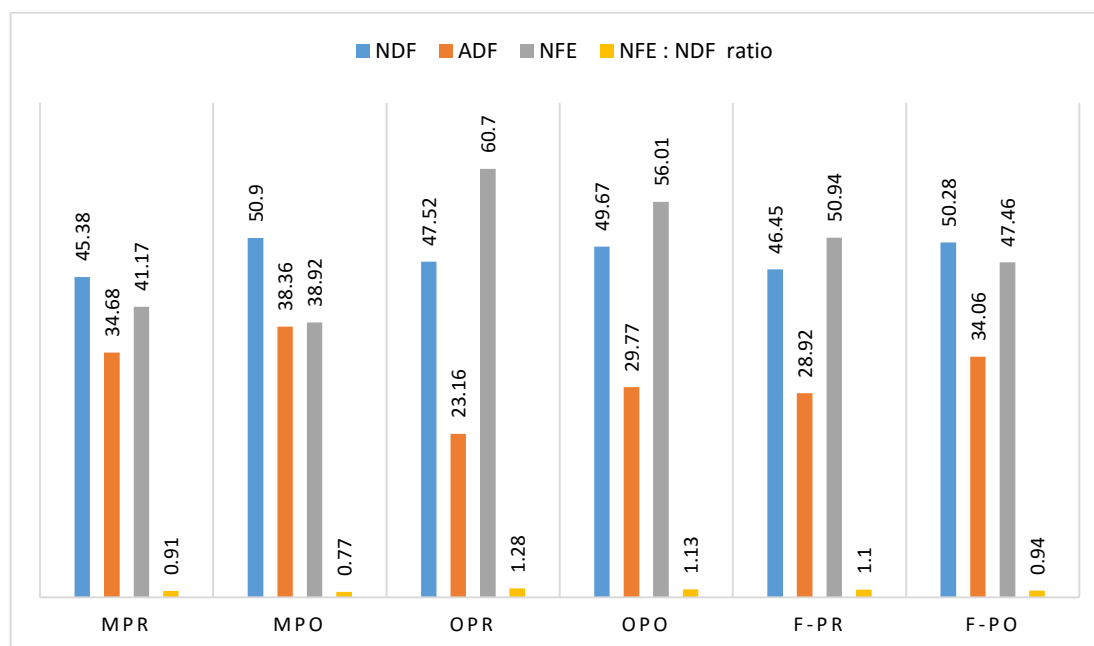


Figure 3. Average values of NDF, ADF, NFE (%) and NFE: NDF ratio in sampled pastures: mixed (M), oat (O) and total forage (F) according to herbage mass type (PR=pre-grazing and PO= post-grazing).

3.2.4.2 Management animal and the ruminal inoculum

The 24 hours *in vitro* fermentation was performed following the recommendations of Theodorou *et al.* (1994). Briefly, dark amber glass bottles containing 0.25 g (DM) of substrate with 45 mL of ruminal inoculum containing 9 parts of reduced mineral solution and one part of the ruminal liquor obtained. The reduced mineral solution was prepared by mixing 750 mL of distilled water, 50 mL of Na₂CO₃ solution (8% w/v), 75 mL type I mineral solution (SMI), 75 mL of type II mineral solution (SMII) and 2 drops of resazurine as the redox indicator, in a bowl in a double boiler incubated at 39°C. The sodium carbonate solution (8%) contained 8.0 g of Na₂CO₃ dissolved in 100 mL of distilled water, the SMI 6.0 g of K₂HPO₄ (dibasic potassium phosphate) in 1000 mL of distilled water; the SMII 6.0 g of monobasic potassium phosphate (KH₂PO₄), 6.0 g of ammonium sulfate ((NH₄)₂SO₄), 12.0 g of sodium chloride (NaCl), 2.45 g of magnesium sulphate (MgSO₄) and 1.6 g of calcium chloride (CaCl₂) dissolved in 1000 mL of distilled water and reducing solution (SR) cysteine-sulfite with 2.5 g of L-cysteine in 15 mL of sodium hydroxide (NaOH) 2N, added to 50 mL of distilled water, 2.5 g of sodium sulfide (Na₂SO₄) and 2 drops of resazurine (1% w/v).

Rumen liquor was obtained separately from intact non-fistulated JY and HJ cows (3 animals per genotype) via stomach tube according to the procedure described by Geishauser *et al.* (2012), but using vacuum pump system for suction. Prior to collection, cows were tranquilized with an *alpha-2 adrenergic agonist* (xylazine at 0.2 mg•kg body weight⁻¹). The average body weight and milk production of animals sampled in mid and late lactation was 368 kg and 12.16 kg.day⁻¹, feeding was exclusively based on grasslands grazing during dry season or less forage offered (January).

Rumen liquor extraction was performed at 07:00h at experimental farm and was transported to the laboratory in a thermal container within 60 minutes from collection. Once in the laboratory, the rumen liquor was filtered through 8 layers

of gauze and the pH was measured using a pH meter (*Microprocessor pH meter, HANNA 211*) immediately before being adding to the mineral reduced solution for incubation.

Determination of gas production was done using 20 mL glass syringes. The volumes of gas produced (mL) was read at 6, 12, 18 and 24 hours of incubation. Equal volume of the gas collected in the syringes was injected in individual glass flasks containing 40 mL of 2N KOH solution, precipitating potassium salts after reaction with CO₂ of the samples, to shed as waste gas volumes (mL) corresponding to CH₄ and other minor gases (mainly H₂, SH₂). The final volume (mL) of gas were obtained by difference between total and residual volumes obtained at each interval.

3.2.4.3 IVDDM analysis of pasture samples

The *in vitro* digestibility of dry matter (IVDDM) was calculated by gravimetric difference between the corresponding initial dry matter (0.25 g) for forage samples subjected to 24 hours of fermentation and the remaining dry matter. Post-fermentation dry matter was recovered using filter paper with 200 micron porosity and subsequent drying at 65 °C for 48 hours, using the following formula:

$$\% \text{ IVDDM} = [(MS_i - MS_f) / MS_i] * 100$$

Where, IVDDM %= *In vitro* digestibility of dry matter percentage, MS_i= initial dry matter in grams (g), MS_f=final dry matter in grams (g).

3.2.4.4 Statistical analysis

The following mixed effects linear model with significant first order interactions was fitted to the experimental data using the MIXED procedure of SAS:

$$y_{ijklmn} = \mu + d_i + q_j + f_k + g_l + df_{ik} + dg_{il} + qfg_{jkl} + animal_m + e_{ijklmn}$$

Where:

y_{ijklmn} is every single value of the response variable IVDMD;

d_i is the fixed effect of day of sampling ($i = 1, \dots, 6$);

q_j is the random effect of sampling quadrat ($j = 1, \dots, 18$) $\sim$ n.i.i.d.($0, \sigma_q^2$);

f_k is the fixed effect of herbage mass type ($k =$ pre-grazing, post-grazing);

g_l is the fixed effect of cow genotype ($l =$ Jersey, Holstein x Jersey);

df_{ik} is the fixed effect of the interaction of day of sampling by herbage mass type;

dg_{il} is the fixed effect of the interaction of day of sampling by cow genotype;

qfg_{jkl} is the random effect of the interaction sampling quadrat by herbage mass type by cow genotype $\sim$ n.i.i.d.($0, \sigma_{qfg}^2$);

$animal_m$ is the random effect of cow ($m = 1, \dots, 6$) $\sim$ n.i.i.d.($0, \sigma_{animal}^2$);

A default variance components structure was specified for the estimation of the random effects. The option DDFM = SATTERTH was specified in the model statement to calculate approximate denominator degrees of freedom for those factors in the model without exact proof, according to the Satterthwaite criterion. Least square means were estimated for the fixed effects and significance tests were calculated from the type 3 tests of fixed effects generated by the MIXED procedure. The options DIFF and ADJFE = ROW were specified in the LSMEANS statement to perform the multiple tests of the least square means.

3.2.5 Results and discussion

3.2.5.1 Solution to random effects

The estimated variance components for the random effects fitted in the model are summarized in Table 14. According to the $Pr > Z$ value generated by the

procedure, the variance components of Quadrat and Animal were not different from zero. In contrast, the variance component of the three-way random interaction given by Quadrat*Herbage mass type*Cow genotype significantly explained most of the variation present in the experiment.

Table 14. Estimated variance components for the random effects fitted to the model to analyze the experimental data comparing the effect of *JY* and *HJ* crossbred cows rumen liquor on the *IVDMD* from pre-grazing and post-grazing herbage mass samples of an organic dairy pasture

Effect	Estimated variance	SE	Z Value	Pr > Z
Quadrat	1.8049	1.5148	1.19	0.1167
Animal	0.2128	0.1817	1.17	0.1207
Quadrat*Herbage mass type*Cow genotype	6.5976	1.5562	4.24	<0.0001
Residual	1.5835	0.1893	8.37	<0.0001

Results agree with those reported by Kolver *et al.* (2002), who contrasting two genetic strain of dairy cows: Overseas *Holstein-Friesian* (*OS HF*) and New Zealand *Holstein-Friesian* (*NZ HF*) found interactions between diets and genotypes for milk and milk solids production, live weight gain during lactation and pregnancy rate. Interestingly, the *OS HF* cows to responded better when fed total mixed rations (TMR) and the *NZ HF* to grass-based pasture diets. However, Zollitsch *et al.* (2014) comparing conventional and adapted genotypes to organic production systems or low input suggested that interactions between genotypes and production systems are largely inconsistent, with greater effect of supplementation or energy intake on the production of milk than the health or the reproductive efficiency of the animals.

3.2.5.2 Solution to fixed effects

The table 15 summarizes the type 3 test of fixed effects fitted in the model. The fixed effects of herbage mass type, cow genotype and the first order interaction between day of sampling by genotype were all significantly related to the *IVDMD* of the pasture, with value slightly greater but nearby for the interaction day of

sampling by herbage mass type to the level of significance considered ($P < 0.0001$).

Table 15. Levels of significance (probability) for the type 3 tests of the fixed effects fitted to the model to analyze the effect of rumen liquor of *JY* and *HJ* crossbred cows on the *IVDMD* of pre-grazing and post-grazing herbage mass samples of an organic dairy pasture.

Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
Day of sampling	5	12	2.36	0.1031
Herbage mass type	1	42	54.23	<0.0001
Cow genotype	1	26.1	85.15	<0.0001
Herbage mass type*Cow genotype	1	36	0.33	0.5698
Day*Herbage mass type	5	42	5.28	0.0007
Day*Cow genotype	5	42	7.62	<0.0001

Differences of *IVDMD* observed for herbage mass type maintains direct relationship with results shown in Figure 2. In addition, Figure 3 shows that in all cases the pre-grazing samples had lower ADF and NDF content and greater NFE:NDF ratio respect to post-grazing, overall average 1.10 vs.0.94. It is well known that there is a positive correlation between nonstructural carbohydrates (NFE) and digestibility or fermentative capacity of substrate (Coblentz *et al.*, 2013) when the pre-grazing forage has less CF and higher NFE; the opposite is observed for the post-grazing forage.

The paradigm that food supplies less digestible as roughages are presumably less fermentable must be revolutionized. The NFE:NDF ratio may be better indicator of forage quality that single NDF and ADF values classically associated with lower voluntary intake and dry matter digestibility (DMD) respectively. The kinetic parameters (substrate colonization times, gas production rate, and final gas volume) of fermentation and *in vitro* methane (CH₄) production improve when the level of nonstructural carbohydrate increases in the ration (Chai *et al.*, 2004; Noguera *et al.*, 2006; Posada-Ochoa *et al.*, 2014).

Evaluating different relationships NFE:NDF, Hadadd and Grant (2000) established a range from 0.7 to 1.2 to maximize fiber digestibility of forage, mediated by direct effect on ruminal pH or the efficient provision of energy for rumen microbial activity. The results found in this study largely agree with those from Hadadd and Grant (2000), being of importance for grazing-based production systems, in which the energy intake has been identified as the most limiting factor for animal performance (O'Mara, 2000). Nevertheless, increasing of the NFE:NDF ratio by increasing the content of fermentable carbohydrates can have an effect on pH and ruminal digestibility as reported by Hadadd and Grand. As Beckman and Weiss (2005), they noted that if large proportions dietary forage fiber is replaced with starch, digestion of NDF is then reduced, because fibrolytic bacteria are sensitive to low pH conditions. Generally, concentrations of starch in feedstuffs are highly variable ranging from 45 to 72% for oat and corn to less than 15% of DM for alfalfa and perennial grass forages (Grant, 2005).

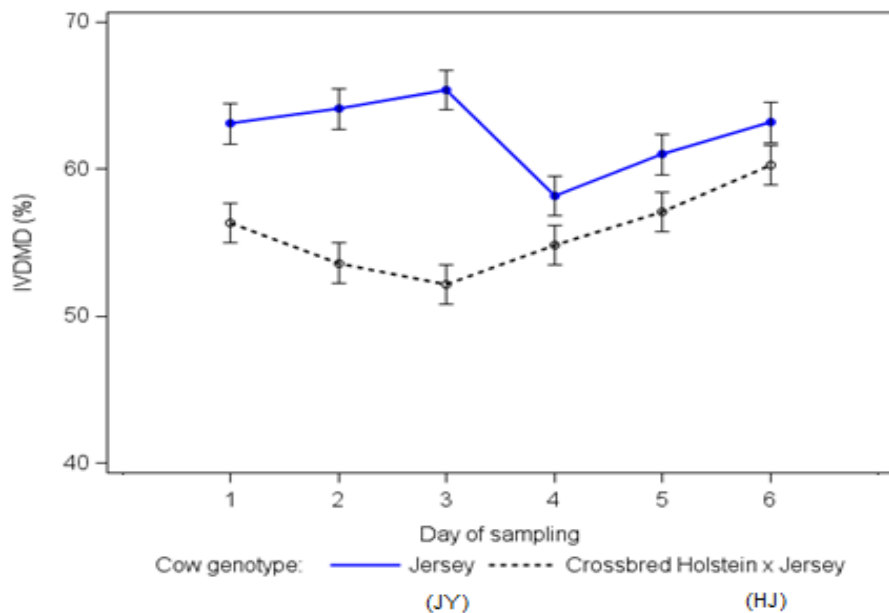


Figure 4. Interaction significant between days of sampling by genotype fitted in the model for IVDMD (%) using rumen liquor of JY and HJ crossbred cows from organic dairy pasture.

The days that have significant interaction with genotype (Figure 4) relate to the composition of the pasture. The first 3 days (week 1 of sampling) correspond to the grass-legume mixed pasture and 3 days following (week 2 of sampling) to a predominant of oat. The detailed botanical composition is shown in Table 13. The nutritional composition is illustrated in figure 2, largely coinciding with data reported by diverse literature referred to growth stage of the predominant roughage: alfalfa with high pre-button and 10% flowering and oat in full flowering and formation of spikelets.

In Figure 3 the oat pasture presented higher values of NFE: NDF ratio compared with the mixed pasture (1.28 vs. 0.91 in pre-grazing, and 1.13 vs. 0.97 in post-grazing). While these values are within the proper referral range, the greatest value of this ratio plus the more advanced phenological stage by oat prairie, could account for the lower *IVDMD* (%) average obtained for both genotypes when comparing oat and mixed pasture (58.85 vs 59.13; s.e.d=1.31; $P<0.0001$). Moreover, higher average values of *IVDMD* (%) obtained in the interaction JY genotype with forage samples of both pastures (64.2 vs. 60.8, s.e.d = 1.31; $P<0.0001$) compared with *IVDMD* (%) to HJ in mixed prairie as oat (54.0 vs. 57.4, s.e.d=1.31; $P<0.0001$).

Results differ from those reported by Coleman *et al.* (2010) who quantifying effects of selection on DMI and feed efficiency (FE) by the economic breeding index, found no significant differences or interaction of genotype in production systems based on grazing, suggesting that in these circumstances the best definition of FE would be associated with greater amounts of milk solids to similar levels of feed intake for the animals, without excessive mobilization of body tissue and maintaining good reproductive performance.

Table 16. Least square means ($\pm$ SE) for the significant fixed in the IVDMD (%) model of pasture samples digested by rumen liquor of purebred JY or HY crossbred cows from an organic dairy pasture

Effect	Level	LSMEAN $\pm$ SE
Herbage mass type	Pre-grazing	61.4 $\pm$ 0.58 ^a
	Post-grazing	56.8 $\pm$ 0.58 ^b
Cow genotype	JY	62.5 $\pm$ 0.61 ^a
	HY	55.7 $\pm$ 0.61 ^b
Day*Cow genotype	D1*JY	63.1 $\pm$ 1.31 ^c
	D2*JY	64.1 $\pm$ 1.31 ^b
	D3*JY	65.4 $\pm$ 1.31 ^a
	D4*JY	58.2 $\pm$ 1.31 ^e
	D5*JY	61.0 $\pm$ 1.31 ^d
	D6*JY	63.2 $\pm$ 1.31 ^c
	D1*HJ	56.4 $\pm$ 1.31 ^f
	D2*HJ	53.6 $\pm$ 1.31 ^h
	D3*HJ	52.2 $\pm$ 1.31 ⁱ
	D4*HJ	54.8 $\pm$ 1.31 ^g
	D5*HJ	57.1 $\pm$ 1.31 ^f
	D6*HJ	60.3 $\pm$ 1.31 ^d

Different literals in columns of same section indicated significant difference ($P < 0.0001$).

Least square means for the significant fixed effects of herbage mass type, cow genotype and the interaction of day by cow genotype are summarized in the Table 16. As expected, the IVDMD (%) of the pre-grazing herbage mass was greater than that of the post-grazing. Likewise, rumen liquor of purebred JY cows yielded higher IVDMD than that of crossbred cows and only the first order interaction day by cow genotype was significant.

Previous studies emphasize higher digestibility for genotype JY respect to purebred Holstein-Friesian (HF) or their crosses HJ associated with greater reticulo-rumen capacity (Prendiville *et al.*, 2010; Xue *et al.*, 2011) without compromising NDF digestibility and milk production (Aikman *et al.*, 2008) due to increasing the food rate or speed of passage often associated to increased DMI.

Beecher *et al.* (2014) studied differences in the digestive tract of cows of different breeds by weighing the overall gastrointestinal tract (including

reticulorumen, omasum, abomasum, intestines and viscera) from 35, 33 and 27 Jersey, Holstein and Holstein × Jersey non-lactating cows after slaughter. The results indicated that the digestive tract of Jersey *and* crossbred cows was heavier compared with purebred Holstein cows, except for liver weight. The upper portion of the digestive tract may contribute to improving the surface of microbial attack for digestion and absorption area (Fritz *et al.*, 2009). The DM herbage digestibility, determined by n-alkanes methodology, of the Holstein and crossbred cows was similar ($P > 0.05$), while Jersey cows digested 2.2% more DM. Finally, by quantitative real-time PCR (qPCR) it was not detected significant differences in the relative abundance of bacteria, protozoa, fungi and *Fibrobacter succinogenes*, but it decreased of *Ruminococcus flavefaciens* in ruminal microbiome of JY compared with HF and HJ cows ($P < 0.001$).

Prendiville *et al.* (2009) comparing systematically the efficiency of milk production based on pastures highlighted the effect of hybrid vigor for maintenance of major body condition score (BCS) by HJ (3.0) compared with J (2.93) and HF (2.76); higher yield milk solids requiring 12.5, 13 and 14.1 FUL (forage units milk: equivalent to the energy provided by one kg of barley) by HJ in F1, JY and HF respectively (2010); differences in grazing behavior (2011) which, however, would contribute less to explain the greater efficiencies for milk solids production by JY genotype, which added to the fact that HF has improved their milk volumes production capacity causes that the intermediate offspring (HJ) is the most farm profitable (2010); results that differ from those reported by Vance *et al.* (2012) that have not reported differences in milk solids per genotypes or Areas (2013) pointing to JY as the most cost-efficient.

Differences in digestibility between JY and HJ by the *in vitro* technique in the present study (4.6%) far exceed those values reported until now. It is important to highlight that small increases in forage digestibility (2-5%) may have a large impact on the animal performance and costs of production (Samac *et al.*, 2012). Equally important, it is the issue of which factor or factors contribute to these differences and the highest yield in milk solids of the JY genotype compared

with their crosses with *HF*. According to Carberry *et al.* (2012), there are differences in FE related to the diversity and density of microbial population.

The ruminal microbiome has proven variable according to physiological (Li *et al.*, 2012) and lactating stage in dairy cows and even among individuals as evidenced by the fact that the cellulolytic population is more variable by the animal itself than by the diet (Weimer *et al.*, 1999) or that it can be reversed soon after transfer the ruminal liquor from another individual (Weimer *et al.*, 2010) suggesting biological interaction between the host and the ruminal microflora (Guan *et al.*, 2008; Benson, 2010) that enable metagenomics applications and predictive models (Lima *et al.*, 2014).

In the present study, contrasting values of initial pH and pH initial deviated from rumen liquor measured immediately before of incubation for $n = 12$, we found average value 0.2 units higher and upper variance for *JY* initial pH ruminal than their crosses *HJ*, but could not detect means differences by the *t-test*, suggesting increasing the sample size or repeats for subsequent occasions because to major biological implications that in dairy cows may have this parameter on the fiber digestibility, acetate: propionate proportion, the ruminal methanogenesis, biohydrogenation of unsaturated fatty acids of the diet and fat milk yield in relation to the bioavailability of hydrogen ions in the rumen, can provide a key biologic to better understanding the differences of digestibility and efficiency of milk solids production presented by the *JY* dairy cows.

3.2.6 Conclusions

Significant effect of herbage mass type, cow genotype and the first order interaction genotype x day of sampling related to the meadows were detected, and this study provides evidence of different *IVDMD*, being even greater than previously reported by other authors for the dairy genotypes considered, meriting more validity by *in vivo* or *in situ* techniques considering the probably impact on performance and profitability of the system.

3.2.7 References

- Aikman, P. C., C. K. Reynolds and D. E. Beever. 2008. Diet digestibility, rate of passage, and eating and rumination behavior of Jersey and Holstein cows. *Journal of Dairy Science* 91: 1103–1114.
- AOAC International. 1995. *Official Methods of Analysis*. 16th ed. P. Cunniff ed., Arlington, VA. P. 630.
- Areaais, M. 2013. Effects on Jerseys and Holsteins: milk production, intake, and feed efficiency. *Dairy Science*. California Polytechnic State University. Available in: <http://digitalcommons.calpoly.edu/dscisp/104>. Accessed 20 July, 2015.
- Beckman, J. L. and W. P. Weiss. 2005. Nutrient digestibility of diets with different fiber to starch ratios when fed to lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 88: 1015-1023.
- Beecher M., F. Buckley, S. M. Waters, T. M. Boland, D. Enriquez-Hidalgo, M. H. Deighton, M. O'Donovan and E. Lewis. 2014. Gastrointestinal tract size, total-tract digestibility, and rumen microflora in different dairy cow genotypes. *Journal of Dairy Science* 97: 1-12.
- Benson, A.K.; A. K. Scott, L. Ryan, M. Fangrui and J. L. Soo. 2010. Individuality in gut microbiota composition is a complex polygenic trait shaped by multiple environmental and host genetic factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107: 18933–18938.
- Berry, D. P., B. Horan, M. O'Donovan, F. Buckley, E. Kennedy, M. McEvoy and P. Dillon. 2007. Genetics of grass dry matter intake, energy balance, and digestibility in grazing Irish dairy cows. *Journal of Dairy Science* 90: 4835–4845.
- Bochi-Brum, O., M. D. Carro, C. Valdés, J. S. González and S. López. 1999. *In vitro* digestibility of forages and concentrates: effect of the diet of donor animals. *Zootechny Archive* 48: 51-61.
- Carberry, C. A., D. A. Kenny, S. Han, M. S. McCabe and S.M. Waters. 2012. Effect of phenotypic residual feed intake and dietary forage content on the rumen microbial community of beef cattle. *Applied Environmental Microbiology* 78: 4949–4958.
- Chai, W. Z., A. H. Van Gelder and J. W. Cone. 2004. Relationship between gas production and starch degradation in feed samples. *Animal Feed Science and Technology* 114: 195-204.
- Coblentz, W. K., K. P. Coffey, A. N. Young and M. G. Bertram. 2013. Storage characteristics, nutritive value, energy content, and *in vivo* digestibility of moist, large rectangular bales of alfalfa-orchard grass hay treated with a propionic acid-based preservative. *Journal of Dairy Science* 96: 2521 – 2535
- Coleman, J., K. M. Pierce, D. P. Berry, A. Brennan and B. Horan. 2010. Increasing milk solids production across lactation through genetic selection and intensive pasture-based feed system. *Journal of Dairy Science* 93: 4302–4317.
- Dillon, P. 2006. Achieving high dry matter intake from pasture with dairy cows. *Fresh herbage for dairy cattle*. Springer. Houten. The Netherlands. 1-26.

- Dixon, R. M. and D. B. Coates. 2015. Application of faecal near infrared spectroscopy to manage the nutrition and productivity of grazing ruminants In: 1st International Conference on Forages in Warm Climates. Brazilian. 207-230.
- Fritz, J., J. R. Hummel, E. Kienzle, C. Arnold, C. Nunn, C. and M. Clauss. 2009. Comparative chewing efficiency in mammalian herbivores. *Oikos* 118: 1623–1632.
- Geishauser, T., N. Linhart, A. Neidl and A. Reimann. 2012. Factors associated with ruminal pH at herd level. *Journal of Dairy Science* 95:4556– 4567.
- Grant, R. 2005. Optimizing starch concentrations in dairy rations. In: *Proceedings of Tri-State Dairy Nutrition Conference*: 73-77.
- Guan, L. L., J. A. Nkrumah, J. A. Basarab and S.S. Moore. 2008. Federation of European Microbiological Societies (FEMS) *Microbiology Letter* 288:85-91.
- Haddad, S. G. and R. J. Grant. 2000. Influence of nonfiber carbohydrate concentration on forage fiber digestion in vitro. *Animal Feed Science and Technology* 86: 107-115.
- Kolver, E. S., J. S. Roche, M. J. de Veth, P. L. Thorne and A. R. Napper. 2002. Total mixed rations versus pasture diets: evidence for a genotype x diet interaction in dairy cow performance. In: *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production* 62: 246-251.
- Li, R. W., E. E. Connor, C. Li, C., R. L. Baldwin and M. E. Sparks. 2012. *Environmental Microbiology* 14: 129–139.
- Lima, F. S., G. Oikonomou, S. F. Lima, M. L. S. Bicalho, E. K. Ganda, J. C. De Oliveira Filho, G. Lorenzo, P. Trojacanec and R. C. Bicalho. 2015. Parturition and postpartum rumen liquor microbiomes: characterization and correlation with production traits in dairy cows. *Applied Environmental Microbiology* 81:1327–1337.
- Noguera, R., C. Ramírez y D. Bolívar. 2006. Efecto de la inclusión de papa (*Solanum tuberosum*) en la cinética de fermentación *in vitro* del pasto kikuyo (*Pennisetum clandestinum*). *Livestock Research for Rural Development* 18: 5.
- O'Mara, F. P. 2000. A Net Energy System for Cattle and Sheep. Version 1.2. University College, Dublin, Ireland. P. 90.
- Prendiville, R., K. Pierce and F. Buckley. 2009. An evaluation of production efficiencies among lactating Holstein-Friesian, Jersey, and Jersey x Holstein-Friesian cows at pasture. *Journal of Dairy Science* 92: 6176–6185.
- Prendiville, R., E. Lewis, K. Pierce and F. Buckley. 2010. Comparative grazing behavior of lactating Holstein-Friesian, Jersey, and Jersey x Holstein-Friesian dairy cows and its association with intake capacity and production efficiency. *Journal of Dairy Science* 93: 764–774.
- Prendiville, R., K. Pierce, L. Delaby and F. Buckley. 2011. Animal performance and production efficiencies of Holstein-Friesian, Jersey and Jersey x Holstein-Friesian cows throughout lactation. *Livestock Science* 138: 25–33.

- Posada-Ochoa, S. L., J. F. Ramírez-Agudelo y R. Rosero-Noguera. 2014. Producción de metano y digestibilidad de mezclas kikuyo (*Pennisetum clandestinum*) - Papa (*Solanum tuberosum*). *Agronomía Mesoamericana* 25: 141-150.
- Reynolds, C. K., L. A. Crompton and J. A. N. Mills. 2011. Improving the efficiency of energy utilization in cattle. *Animal Production Science* 51: 6-12.
- Rossi, J. L., K. A. Macdonald, B. S. Thorrold and J. Hodgson. 2005. Behaviour and intake of dairy cows. In: *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production* 64: 232-236.
- Samac, D., L. Joann, J. J. Hans. 2012. Alfalfa for maximum livestock nutrition & forage yield. Schnurr. Annual report of National Program USDA-ARS. Available in: www.ars.usda.gov/research/projects/projects.htm?ACCN_NO=412540&fy=2012. Accessed 20 July. 2015.
- SAS. 2011. SAS Systems Software, SAS Institute Inc., Cary, NC.
- Serment, A., S. Giger-Reverdin, P. Schmidely, O. Dhumez, L.P. Broudiscou and D. Sauvant. 2015. *In vitro* fermentation of total mixed diets differing in concentrate proportion: relative effects of inocula and substrates. *Journal Science Food Agriculture* 96: 160-168.
- Stalker, L. A., B. G. Lorenz, N. A. Ahern and T. J. Klopfenstein. 2013. Inclusion of forage standards with known *in vivo* digestibility in *in vitro* procedures. *Livestock Science* 151: 198-2002.
- Tagliapietra, F., M. Cattani, I. K. Hindrichsen, H. Hansen, H. Hanne, H., S. Colombini, L. Bailoni and S. Schiavon. 2012. True dry matter digestibility of feeds evaluated *in situ* with different bags and *in vitro* using rumen liquor collected from intact donor cows. *Animal Production Science* 52: 338–346.
- Theodorou, M. K., B. A. Williams, M. S. Dhanoa, A. B. Meallan and J. France. 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology* 48: 185-197.
- Thorne, P. L., J. G. Jago, E. S. Kolver and J. R. Roche. 2003. Diet and genotype affect feeding behaviour of Holstein-Friesian dairy cows during late lactation. In: *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production* 63: 124-127.
- Vance, E., C. Ferris, C. Elliott, C. and D. Kilpatrick. 2012. A comparison of the feeding and grazing behaviour of primiparous Holstein- Friesian and Jersey × Holstein-Friesian dairy cows. *Irish of Journal Agricultural and Food Research* 51: 45–61.
- Van Soest, P. J., J. B. Robertson and B. A. Lewis. 1991. Methods for dietary fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science* 74: 3583–3597.
- Van Soest, P. J. 1994. *Nutritional Ecology of the Ruminant*. Cornell University Press, Ithaca, New York. P. 479.
- Weimer, P. J.; G. Waghorn, C. Odt and D. Mertens. 1999. Effect of diet on populations of three species of ruminal cellulolytic bacteria in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 82: 122–134.

- Weimer, P. J. and S. L. C. Man. 2010. Host specificity of the ruminal bacterial community in the dairy cow following near-total exchange of ruminal contents. *Journal of Dairy Science* 93: 5902- 5912.
- Weiss, P. E. 1994. Estimation of Digestibility of Forages by Laboratory Methods. In: *Forage Quality Evaluation and Utilization*. American Society of Agronomy, Crop Science Society of America and Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin: 644-681.
- Xue, B., T. Yan, C. Ferris and C. Mayne. 2011. Milk production and energy efficiency of Holstein and Jersey-Holstein crossbred dairy cows offered diets containing grass silage. *Journal of Dairy Science* 94:1455–1464.
- Zollitsch, W., C. Ferris, A. Sairanen, M. Rinne, A. Steinwiddler, M. Horn, J. Moorby and M. Vestergaard. 2014. Adapted vs. conventional cattle genotypes: suitability for organic and low input dairy production systems. In: *Proceedings of the 4th ISOFAR Scientific Conference 'Building organic bridges' at the Organic World Congress*: 25-28.