



Universitat de Lleida

Emisión de amoníaco (NH₃) y gases con efecto invernadero (CH₄ y N₂O) en cerdos en crecimiento: efecto del nivel de proteína y fibra de la ración

Henris Jobany Morazán Nuñez

Dipòsit Legal: L.156-2015

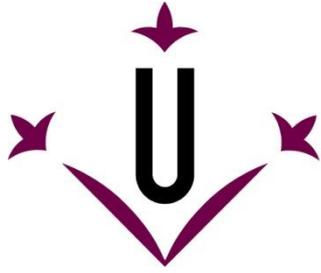
<http://hdl.handle.net/10803/285580>



Emisión de amoníaco (NH₃) y gases con efecto invernadero (CH₄ y N₂O) en cerdos en crecimiento: efecto del nivel de proteína y fibra de la ración està subjecte a una llicència de [Reconeixement-NoComercial-SenseObraDerivada 3.0 No adaptada de Creative Commons](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/)

Les publicacions incloses en la tesi no estan subjectes a aquesta llicència i es mantenen sota les condicions originals.

(c) 2014, Henris Jobany Morazán Nuñez



Universitat de Lleida
Departament de Producció
Animal

**Emisión de amoníaco (NH_3) y gases con efecto
invernadero (CH_4 y N_2O) en cerdos en crecimiento: efecto
del nivel de proteína y fibra de la ración**

Memoria presentada por Henris Jobany Morazán Nuñez
para optar el grado de Doctor por la Universidad de Lleida

Directores

Dr. Joaquim Balcells Terés y Dr. Daniel Babot Gaspa

Tesis Doctoral

Lleida, 2014

Prólogo.

La realización de la presente memoria de tesis doctoral ha sido posible gracias a la financiación del proyecto “Estudio del efecto de la nutrición y del manejo de purines sobre la emisión de gases (NH_3 , CH_4 y N_2O) en cerdos de engorde y cerdas en lactación” [CICYT: AGL 2010-20820]. El autor ha recibido también el soporte económico de los Proyectos UdL (Proyecto: C10058, C11006 y Z00000).

Agradecimientos.

A mi padre QDDG, mi madre, mis hermanos (a) s, mi pareja, suegros y cuñados (a) por su apoyo incondicional en cada momento,

A familiares y amigos que han estado siempre al pendiente de la familia durante mi ausencia,

A la UdL-ETSEA, por brindarme la oportunidad de cursar estudios de doctor en su sistema de formación profesional,

A los profesores Dr. Joaquim Balcells Terés y Daniel Babot Gaspa, directores del trabajo de tesis, y especialmente a Balcells por todos sus consejos, paciencia, comentarios y ayuda tanto en el ámbito científico como en lo personal,

A Javier Álvarez, Ahmad Reza Seradj y Daniel Villalba por su colaboración en la parte experimental y análisis de datos, por todas las horas gastadas en el laboratorio y campo, sus aportaciones y sugerencias, sus críticas constructivas y por los buenos ratos que me han hecho pasar,

Al grupo de trabajo de departamento de Producción Animal y al personal de Servicios Científico Técnicos del Departamento de Química de la Universidad de Lleida “ETSEA”, que tuve la oportunidad de conocer y que de una u otra manera me brindaron su apoyo en la realización de la investigación,

A los investigadores, técnicos y personal de campo de la Estación Experimental de Zaidín (CSIC, en Granada), Instituto de Ganadería de Montaña (CSIC-Universidad de León, en León) y del Centre d’Estudis Porcins de Catalunya (CEP, en Lleida) que aportaron sus conocimientos, experiencias, equipos analíticos e instalaciones,

A los compañeros que tuve la oportunidad de conocer y apoyar mientras cursaron estudios (de grado, máster y doctor) en el departamento de Producción Animal,

Al Dr. Joaquim Balcells Terés y Daniel Villalba Mata por el soporte económico brindado de proyectos UdL (Proyecto: C10058, C11006 y Z00000),

A la Universidad Nacional de Agricultura (UNA: Honduras) por brindarme el permiso laboral para poder cursar estudios de pos-grado y a los amigos que en ella laboran que siempre me han apoyado,

Muchas gracias a todos.

Índice General

Lista de abreviaturas.....	xiii
Resum.....	xiv
Resumen.....	xv
Summary.....	xvi
I. INTRODUCCIÓN Y PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL.....	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	9
2.1. Emisión de gases tóxicos en ganadería porcina: Amoníaco (NH ₃) y gases con efecto invernadero [GEI: metano (CH ₄) y óxido nitroso (N ₂ O)].....	11
2.1.1. Emisión de metano (CH ₄).....	11
2.1.1.1. Síntesis de CH ₄	13
2.1.1.1.1. Síntesis de CH ₄ : Fase (I) Hidrólisis.....	14
2.1.1.1.2. Síntesis de CH ₄ : Fase (II) Acidogénesis.....	16
2.1.1.1.3. Síntesis de CH ₄ : Fase (III) Acetogénesis.....	16
2.1.1.1.4. Síntesis de CH ₄ : Fase (IV) Metanogénesis.....	17
2.1.1.2. Emisión de CH ₄ en ganado porcino.....	20
2.1.2. Emisión de amoníaco (NH ₃).....	23
2.1.3. Emisión de óxido nitroso (N ₂ O).....	31
2.2. Emisión de amoníaco y gases con efecto invernadero (GEI) en ganado porcino: factores modificantes.....	33
2.2.1. Tipo y estrategias en alimentación.....	34
2.2.1.1. Proteína: Composición cualitativa y cuantitativa.....	34
2.2.1.2. Hidratos de carbono estructurales o no amiláceos: Utilización de fibra.....	35
2.2.1.3. Utilización de acidificantes o aceites en alimento y/o purín.....	37
2.2.1.4. Alimentación en fases.....	38
2.2.1.5. Alimentación separada: Sexo.....	38
2.2.2. Reducción en la emisión de GEI y NH ₃ : Alojamiento.....	39
2.2.2.1. Tipo de suelo del alojamiento.....	39
2.2.2.2. Tipo y material de la cama.....	40
2.2.2.3. Diseño del alojamiento y del sistema de recogida del purín.....	41
2.2.2.4. Sistema y caudal de ventilación: Regulación de la temperatura.....	42
III. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL.....	45
IV. MATERIAL Y MÉTODOS.....	51
4.1. Desarrollo metodológico.....	53
4.1.1. Procedimiento de estimación directa de la emisión de gases en instalaciones convencionales: Emisión entérica vs emisión procedente de las deyecciones.....	53
4.1.1.1. Instalaciones.....	53
4.1.1.2. Sistema de determinación de la emisión gaseosa en los módulos.....	54
4.1.1.3. Sistema de medición de la emisión procedente de la fosa de deyecciones.....	55
4.1.1.4. Ensayo previo: puesta a punto del procedimiento de medida.....	56
4.1.1.4.1. Animales.....	56
4.1.1.4.2. Raciones.....	57
4.1.1.4.3. Desarrollo experimental.....	58

a). <i>Parámetros productivos</i>	58
b). <i>Emisión de gases</i>	58
c). <i>Volumen del purín</i>	59
d). <i>Muestreo del purín</i>	59
4.1.2. Emisión potencial de biogás del purín: Procedimiento de optimización	60
4.1.2.1. <i>Inóculo</i>	60
4.1.2.2. <i>Co-inóculo</i>	61
4.1.2.3. <i>Sustratos</i>	61
4.1.2.4. <i>Desarrollo experimental</i>	61
4.1.2.5. <i>Preparación de los medios de incubación</i>	62
4.1.2.6. <i>Toma de muestras y conservación</i>	64
4.1.2.6.1. <i>Muestreo de la fase gaseosa</i>	64
4.1.2.6.2. <i>Muestreo de la fase líquida</i>	64
4.1.2.6.3. <i>Determinaciones químicas</i>	64
a). <i>Principios inmediatos</i>	65
b). <i>Ácidos grasos volátiles (AGV) y nitrógeno amoniacal</i>	65
c). <i>Metano</i>	66
d). <i>Aislamiento de ADN y cuantificación microbiana de bacterias, arqueas totales y arqueas metanogénicas hidrogenotróficas (AMH) por qPCR</i>	66
e). <i>Análisis de Biodiversidad de AMH</i>	67
4.2. Emisiones de GEI en cerdos	68
4.2.1. Fase de Transición	68
4.2.1.1. <i>Instalaciones</i>	68
4.2.1.2. <i>Animales</i>	68
4.2.1.3. <i>Alimentación</i>	68
4.2.1.4. <i>Procedimiento Experimental</i>	69
a). <i>Parámetros productivos</i>	69
b). <i>Emisión en sala</i>	70
b.1). <i>Muestreo del aire</i>	70
c). <i>Emisión en Fosa</i>	71
4.2.1.5. <i>Tratamiento Purín</i>	71
4.2.1.6. <i>Determinaciones químicas</i>	72
4.2.2. Fase de Cebo: Estudio del nivel de fibra y proteína de la ración sobre los parámetros productivos y niveles de GEI	73
4.2.2.1. <i>Animales</i>	73
4.2.2.2. <i>Instalaciones</i>	73
4.2.2.3. <i>Raciones</i>	73
4.2.2.4. <i>Desarrollo experimental</i>	77
a. <i>Ingestión voluntaria y niveles de crecimiento</i>	77
b. <i>Balance de digestibilidad</i>	77
c. <i>Volumen y composición del purín generado</i>	78
d. <i>Emisión de gases efecto invernadero (GEI)</i>	78
d.1. <i>Emisión potencial de metano de las deyecciones (purín) y heces de cerdo</i>	78
d.1.1. <i>Evaluación del potencial de emisión de metano en las deyecciones</i>	78
d.1.2. <i>Evaluación del potencial de emisión de metano en las heces</i>	78
e. <i>Sacrificio y composición de la canal</i>	78
4.2.2.5. <i>Determinaciones químicas</i>	79
4.2.2.6. <i>Extracción de ADN y determinación de la concentración bacteriana de arqueas metanogénicas hidrogenotróficas y acetoclásticas (Methanosarcina spp. y Methanosaeta)</i>	79

4.3. Cálculos y análisis estadístico.....	80
4.3.1. <i>Puesta a punto</i>	80
4.3.2. <i>Producción potencial de CH₄ “in vitro”</i>	80
4.3.3. <i>Análisis correspondiente a la Fase de transición</i>	82
4.3.4. <i>Efecto PB y FND sobre parámetros productivos y emisión gaseosa</i>	82
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	87
5.1. Estimación directa de la emisión de gases en instalaciones convencionales: Emisión entérica vs emisión de las deyecciones.....	89
5.1.1. <i>Condiciones de muestreo</i>	89
5.1.2. <i>Animales: Parámetros productivos</i>	90
5.1.3. <i>Ventilación: Flujos de salida</i>	91
5.1.3.1. Módulos Estancos (ME).....	91
5.1.3.2. Campanas de flujo continuo (CFC).....	92
5.1.4. <i>Protocolo de muestreo</i>	93
5.1.5. <i>Emisiones de metano y amoníaco a partir de los módulos estancos (ME)</i>	97
5.1.6. <i>Emisiones de metano y amoníaco a partir de las campanas de flujo continuo (CFC)</i>	99
5.2. Estimación de la capacidad potencial de emisión del purín: emisión de metano.....	103
5.2.1. <i>Efecto de la concentración del purín sobre la producción de gas y metano</i>	103
5.2.2. <i>Efecto del tipo de sustrato sobre la producción de gas y metano</i>	106
5.2.3. <i>Efecto del nivel de co-inóculo sobre la producción de gas y metano</i>	108
5.2.4. <i>Cambios en los niveles de pH y concentraciones de NH₄ y AGV en el medio de incubación a lo largo del periodo de incubación</i>	109
5.2.4.1. Acidez del medio (pH).....	110
5.2.4.2. Concentración de nitrógeno amoniacal (N-NH ₄ ⁺).....	111
a). <i>Cambios en la concentración de N-NH₄⁺ inducida por la concentración de purín y el tipo de sustrato</i>	111
b). <i>Cambios en la concentración de N-NH₄⁺ inducida por el nivel de co-inóculo</i>	112
5.2.4.3. Evolución de los ácidos grasos volátiles (AGV) y sus proporciones molares.....	112
5.2.5. <i>Evolución de las poblaciones bacterianas en el sistema de fermentación</i>	118
5.2.5.1. Evolución de los títulos bacterianos: Bacterias totales (BT).....	118
5.2.5.2. Arqueas metanogénicas hidrogenotróficas.....	119
5.2.5.3. Estructura de la población de AHM: Biodiversidad.....	122
5.2.6. <i>Producción de CH₄: “metanización” total del sustrato y modelos de respuesta</i>	123
5.3. Emisión de NH ₃ y GEI en cerdos: fase de transición.....	126
5.3.1. <i>Condiciones ambientales</i>	126
5.3.2. <i>Parámetros productivos</i>	127
5.3.3. <i>Concentraciones de NH₃ y GEI registradas en los módulos de transición</i>	127
5.3.4. <i>Emisiones registradas de NH₃ y GEI (CH₄ y N₂O) en cerdos en transición</i>	129
5.3.5. <i>Producción y composición del purín en cerdos en transición</i>	134
5.4. Efecto del nivel de fibra y proteína de la ración sobre los parámetros productivos y la emisión gaseosa en cerdos en cebo.....	135
5.4.1. <i>Efecto del nivel de fibra y proteína de la ración sobre los parámetros productivos</i>	135
5.4.1.1. Resultados.....	135
5.4.1.1.1. <i>Crecimiento</i>	135
5.4.1.1.2. <i>Digestibilidad</i>	136
5.4.1.1.3. <i>Cantidad de nutrientes digeridos a través del tracto intestinal</i>	137
5.4.1.1.4. <i>Producción y composición del purín</i>	139

5.4.1.1.5. Características de la canal.....	141
5.4.1.2. Discusión.....	142
5.4.1.2.1. Efecto del nivel de PB.....	142
5.4.1.2.2. Efecto del incremento en el nivel de FND a partir de la inclusión de pulpa de remolacha.....	143
5.4.1.2.3. Estudio del efecto de la interacción entre el aporte de PB y FND.....	144
5.4.2. Efecto del nivel de fibra y proteína de la ración sobre la emisión de gases tóxicos: CH₄ y gases nitrogenados (NH₃ y N₂O).....	146
5.4.2.1. Emisión de metano: efecto del nivel de fibra y proteína de la ración.....	148
5.4.2.2. Emisión de amoníaco: efecto del nivel de fibra y proteína de la ración.....	158
5.4.2.3. Emisión de óxido nitroso: efecto del nivel de fibra y proteína de la ración.....	169
5.4.3. Condiciones de fermentación y evolución de las poblaciones microbianas en el intestino grueso a lo largo del tracto ceco-colónico y en el purín: Efecto del nivel de fibra y proteína de la ración.....	178
5.4.3.1. Condiciones de fermentación en el intestino grueso.....	178
5.4.3.2. Condiciones de fermentación: purín.....	181
5.4.3.3. Concentración de bacterias totales y arqueas metanogénicas en intestino grueso.....	183
5.4.3.4. Concentración de bacterias totales y arqueas metanogénicas en el purín.....	188
5.4.4. Evaluación del potencial de producción de metano de heces y el purín.....	191
VI. CONCLUSIONES.....	193
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	201
VIII. ANEXOS.....	221
8.1. Comunicaciones en congresos.....	223
8.2. Publicaciones.....	223
8.2.1. Morazán H., Seradj, A.R., Álvarez-Rodríguez J., Abecia, L., Babot, D., Yáñez-Ruíz, D., Balcells, J., 2014. Effect of slurry dilution, structural carbohydrates, and exogenous Archaea supply on <i>in vitro</i> anaerobe fermentation and methanogens population of swine slurry. <i>Environmental Progress & Sustainable Energy</i>, DOI 10.1002/ep.11952.....	225
8.2.2. Morazán, H., Alvarez-Rodriguez, J., Seradj, A.R., Balcells, J., Babot, D. Trade-offs among growth performance, nutrient digestion and carcass traits when feeding low protein and/or high neutral-detergent fiber diets to growing-finishing pigs. <i>Journal of Animal Science</i>. Manuscript ID. E-2014-8344. Submitted 31-Jul-2014.....	237

Índice de tablas

Tabla 2.1. Bacterias hidrolíticas que participan en la digestión anaerobia de los diferentes sustratos. Monroy (1998).....	15
Tabla 2.2. Grupos bacterianos que participaran en la fase acetogénica.....	17
Tabla 2.3. Clasificación de las arqueas metanogénicas (Monroy, 1998; Saengkerdsub <i>et al.</i> , 2014).....	19
Tabla 2.4. Emisiones de CH ₄ , NH ₃ y N ₂ O en ganado porcino (European Commission, 2003) en función de la fase productiva y tipo de alojamiento (Mínimos y máximos expresados en kg an/año).....	21
Tabla 2.5. Eficacia en la utilización del N ingerido en las diferentes especies de abasto.....	29
Tabla 2.6. Niveles de emisión de NH ₃ registradas en diferentes especies y tipos de alojamientos expresados en g NH ₃ por plaza y año (Calvet, 2007).....	30
Tabla 2.7. Eficiencia medio ambiental de alojamiento propuestos por el MARM (2010a) respecto al sistema de referencia convencional.....	42
Tabla 4.1. Ingredientes y sus proporciones (%) utilizadas en la ración experimental.....	57
Tabla 4.2. Composición química estimada a partir de la composición de ingredientes (Tablas electrónicas FEDNA, 2010).....	58
Tabla 4.3. Composición de los medios de incubación diseñada para las tres concentraciones de purín original (Pur10).....	61
Tabla 4.4. Composición bromatológica (% sobre MS) de los inóculos (Heces de vacuno y cerdo) y de los sustratos (paja de cebada y pulpas de manzana y remolacha).....	62
Tabla 4.5. Composición del tampón mineral (Fondevila y Pérez Espés 2008).....	63
Tabla 4.6. Concentración de inóculo (heces de cerdo, HC), sustrato y co-inóculo (Heces de vaca, HV) (mg/botella) utilizado en cada uno de los tratamientos experimentales y sus correspondientes blancos.....	63
Tabla 4.7. Temperaturas empleadas en la rampa del horno del cromatógrafo utilizado para la determinación de los AGV.....	65
Tabla 4.8. Autores y secuencia de cebadores utilizados.....	67
Tabla 4.9. Composición de ingredientes de las raciones utilizadas.....	69
Tabla 4.10. Composición química (% MS) de las raciones.....	69
Tabla 4.11. Ingredientes y aditivos (g/kg de MF) de las dietas en las 3 fases experimentales, difiriendo en el contenido de PB (alta, AP vs baja, BP) y/o en contenido de FND (normal, NF vs alta, AF) provistas de 15 a 100 kg de PV.....	74
Tabla 4.12. Energía y composición de las dietas experimentales, difiriendo en contenido de PB (alta, AP vs baja, BP) y/o FND (normal, NF vs alta, AF) de 6 a 21 semanas de edad (programa de 3 fases de alimentación) (valores analizados expresados en g/kg de MF a menos que se indique lo contrario).....	76
Tabla 5.1.1. Resultados productivos [Pesos vivo (PV), Ganancia media diaria (GMD), Ingestión media diaria (IMD) y Índice de conversión (IC= relación pienso/ganancia] para cerdos en cebo, alimentados en dos fases con una ración convencional hasta 100 kg PV.....	90
Tabla 5.1.2. Potencia de extracción (potencia 0,26 Kw, caudal máximo 4000 m ³ /h) y flujo de aire registrado en los cuatro módulos estancos (ME) en ambas fases experimentales.....	92
Tabla 5.1.3. Temperatura ambiente (T ^a Exterior), interior (T ^a Interior) y humedad relativa (H. Relativa) en cada uno de los módulos estancos (ME = 4).....	92
Tabla 5.1.4. Valor medio de la temperatura, pH y profundidad del purín junto con el ritmo de aireación de las CFC, expresado L/m ² /h (n = 4 Fosas).....	93
Tabla 5.1.5. Emisión diaria de gases (NH ₃ y CH ₄), expresados en valores absolutos (g) o	

referidos al peso metabólico (mg/kgPV ^{0,75}) registrada en los módulos estancos (ME) en los que se alojaron los animales, cerdos línea paterna Pietrain y línea materna, Landrace x Duroc alimentados con raciones convencionales a los 59,5 s.e. 1,08 kg (FI) y 96,8 s.e. 1,09 kg (FII).....	96
Tabla 5.1.6. Emisión de NH ₃ (g an/d o mg/kg PV) obtenidos a partir de la bibliografía considerando los siguientes factores métodos analíticos, nivel de proteína, tipo de suelo y temperatura.....	96
Tabla 5.1.7. Emisión de CH ₄ (mg/kg PV ^{0,75} o mg/kg PV), obtenidos a partir de la bibliografía considerando los siguientes factores: métodos analíticos, nivel de fibra, tipo de piso y temperatura.....	98
Tabla 5.1.8. Emisión diaria de gases (NH ₃ y CH ₄), expresados en valores absolutos (g/d) o referidos al peso metabólico (mg/kgPV ^{0,75} /d) procedente de las deyecciones almacenadas en la fosa. Las deyecciones procedieron de cerdos en cebo de línea paterna Pietrain y línea materna, Landrace x Duroc alimentados con raciones convencionales a los 59,5 s.e. 1,08 kg (FI) y 96,8 s.e. 1,09 kg (FII).....	100
Tabla 5.1.9. Emisión de NH ₃ (g/m ²) de las deyecciones obtenidos a partir de la bibliografía considerando los siguientes factores: métodos analíticos, nivel de PB, tipo de alojamiento y temperatura.....	100
Tabla 5.1.10. Emisión de CH ₄ (g/m ³ o g/m ²) de las deyecciones obtenidos a partir de la bibliografía considerando los siguientes factores: procedimiento de muestreo, nivel de PB, temperatura.....	102
Tabla 5.2.1. Producción media de metano (ml/g MO) a lo largo del periodo de incubación. Los niveles de producción corresponden a los valores obtenidos para cada purín y sustrato suplementado (Interacción concentración de purín x tipo de sustrato). (Blanco; paja de cereal (PCe); pulpa de remolacha (PR) y manzana (PM).....	108
Tabla 5.2.2. Parámetros químicos en los medios de fermentación (pH, NH ₄ ⁺ y AGV) y su relación con la concentración de purín (2, 4 y 6 g MS/100 ml), tiempo de incubación (0, 25 y 56 días) y sustrato suplementado (600 mg MS/botella: Paja de cereal [PCe], Pulpa de manzana [PM] o Pulpa de remolacha [PR]).....	116
Tabla 5.2.3. Concentración media de ácidos grasos volátiles (AGV) y proporción relativa (mmol/100mmol) de acético en las botellas donde se incubaron los diferentes sustratos (blanco, paja de cereal y las pulpas de manzana y remolacha) al final del periodo de incubación (56 días, T56). Interacción; tipo de sustrato x concentración de purín.....	117
Tabla 5.2.4. Efecto del tipo de sustrato suplementado (600 mg MS/botella; paja de cereal (PCe), pulpa de manzana (PM) o pulpa de remolacha (PR)), tiempo de incubación (0, 25 y 56 días) y nivel de co-inóculo (al 0, 5 ó 10% de MS/botella) en producción de metano (ml), abundancia de bacterias totales en el medio (gen molecular 16S-rARN/g MF), arqueas totales [% de bacterias totales; ΔC(t)] y metanógeno hidrogenotróficas [% de arqueas totales; ΔC(t)] en purín al 4% MS.....	121
Tabla 5.2.5. Valores medios de producción acumulada de metano a 56 días post-incubación junto con los parámetros obtenidos mediante el ajuste del modelo Gompertz a los valores de producción de CH ₄ registrados en el purín con una concentración de MS del 4% suplementando los medios de cultivo con diferentes tipos de carbohidratos (Blanco, 0; Paja de cereal, PCe; Pulpas de manzana, PM y de remolacha, PR) e inoculado arqueas exógenas (heces frescas de vaca: 0, 5 y 10% de la MS del inóculo).....	125
Tabla 5.3.1. Condiciones ambientales registradas durante el periodo del muestreo de gases en los módulos estanco (temperatura, humedad relativa y flujo de renovación) y en la fosa de deyecciones [(temperatura (°C), pH, altura del purín (cm) y renovación del aire (L/m ² /h)].....	126
Tabla 5.3.2. Parámetros productivos [Pesos vivo (PV), Ganancia media (GMD), Ingestión	

media de materia fresca (IMF \approx 88% MS) y Índice de conversión (IC = IMF/GMD) registrados en cerdos en fase de transición.....	127
Tabla 5.3.3. Emisión de NH ₃ y GEI (CH ₄ y N ₂ O) en cerdos en transición (PV = 22,54 s.e. 0,52 kg) recibiendo una ración comercial (PB: 16,7%; FND: 9,9%). Los niveles de emisión corresponden a la emisión total (Módulos) y la procedente del almacenamiento de las deyecciones (CFC, Fosas).....	130
Tabla 5.3.4. Parámetros productivos y emisión de NH ₃ y GEI obtenidos a partir de datos bibliográficos registrados en explotaciones de ganado porcino en fase de transición.....	133
Tabla 5.3.5. Composición analítica y valor fertilizante del purín procedente de las fosas de cerdos en transición muestreado a los 38 días).....	134
Tabla 5.4.1.1. Parámetros productivos [peso vivo, PV; ingestión media diaria (IMD); ganancia media diaria (GMD); índice de conversión (IC); y eficiencia energética calculada] para cerdos en crecimiento-cebo, alimentados a distintos niveles de PB (alta, AP vs baja, BP) y/o FND (normal, NF vs alta, AF) de la ración entre las 6 y 21 semanas de edad (FI: 6-11, FII: 12-16, FIII: 17-21 semanas).....	136
Tabla 5.4.1.2. Coeficiente de digestibilidad aparente (%) y cantidad de nutrientes digeridos (kg/d o g/d) para cerdos en crecimiento-engorde afectados por el nivel de PB (alta, AP vs baja, BP) y/o FND (normal, NF vs alta, AF) de la dieta suministrada de 6 a 21 semanas (s) de edad.....	139
Tabla 5.4.1.3. Parámetros de rendimiento en la canal, afectados por el nivel de PB (alta, AP vs baja, BP) y/o contenido de FND (normal, NF vs alta AF) de la ración suministrada durante su crecimiento-engorde.....	141
Tabla 5.4.2.1. Valores medios de las condiciones físico-químicas registradas en los módulos estancos y en fosas de deyecciones durante los periodos de muestreo.....	147
Tabla 5.4.2.2. Emisión diaria de CH ₄ en sala (módulos estancos: ME), en cerdos en cebo alimentados con raciones a dos niveles de proteína (PB: AP y BP) y dos de fibra digestible (FND: AF y NF) en un sistema de alimentación en tres fases, a los 33, 66 y 102 kg PV (Fases I, II y III).....	151
Tabla 5.4.2.3. Emisión diaria de CH ₄ originada a partir de las deyecciones (fosas), estimada a partir de la colocación de CFC en las fosas de cerdos en cebo alimentados con raciones a dos concentraciones de proteína (PB: AP y BP) y dos de fibra (FND: AF y NF) en un sistema de alimentación en tres fases, a los 33, 66 y 102 kg PV.....	153
Tabla 5.4.2.4. Emisión de CH ₄ (mg/kg PV o g an/d) obtenidos a partir de la bibliografía considerando los siguientes factores: métodos analíticos, nivel de proteína y fibra, tipo de suelo y temperatura. Emisión total (emisión entérica + fermentación de deyecciones)..	156
Tabla 5.4.2.5. Emisión de CH ₄ (g/m ³) obtenidos a partir de la bibliografía considerando los siguientes factores métodos analíticos, nivel de proteína, tipo de alojamiento y temperatura. Emisión a partir de la fermentación de deyecciones.....	157
Tabla 5.4.2.6. Emisión diaria de NH ₃ en sala (módulos estancos), en cerdos en cebo alimentados con raciones a dos concentraciones de proteína (PB: AP y BP) y dos de fibra (FND: AF y NF) en un sistema de alimentación en tres fases, a los 33, 66 y 102 kg PV (Fases I, II y III).....	160
Tabla 5.4.2.7. Emisión diaria de NH ₃ del espacio de cabeza de las CFC (deyecciones) de las fosas donde se alojaban cerdos en cebo alimentados con raciones a dos concentraciones de proteína (PB: AP y BP) y dos de fibra fermentable (FND: AF y NF) en un sistema de alimentación en tres fases, a los 33, 66 y 102 kg PV (Fases I, II y III). Los valores de emisión se presentan expresados en función de los animales o el purín almacenados.....	164
Tabla 5.4.2.8. Emisión de NH ₃ (mg/kgPV o g an/d) obtenidos a partir de la bibliografía considerando los siguientes factores: métodos analíticos, nivel de proteína, tipo de suelo	

y temperatura.....	167
Tabla 5.4.2.9. Emisión de NH ₃ (g/m ²) de las deyecciones obtenidas a partir de la bibliografía considerando los siguientes factores: métodos analíticos, nivel de proteína, tipo de alojamiento y temperatura.....	168
Tabla 5.4.2.10. Emisión total de N ₂ O en sala (módulos estancos), en cerdos en cebo alimentados con raciones a dos concentraciones de proteína (PB: AP y BP) y dos de fibra (FND: AF y NF) en un sistema de alimentación en tres fases, a los 33, 66 y 102 kg PV (Fases I, II y III).....	172
Tabla 5.4.2.11. Emisión de N ₂ O en fosa de cerdos en crecimiento, determinado la emisión gaseosa en 3 fases (PV= 33, 66 y 102 kg).....	176
Tabla 5.4.2.12. Emisión de N ₂ O (mg/kgPV ^{0.75} o g an/d), obtenidos a partir de la bibliografía considerando los siguientes factores: métodos analíticos, tipo de suelo y temperatura.....	177
Tabla 5.4.3.1. Condiciones de fermentación a nivel digestivo: efecto del nivel de proteína (PB) y fibra neutro detergente en la dieta (FND).....	181
Tabla 5.4.3.2. Condiciones de fermentación en el purín.....	182
Tabla 5.4.3.3. Efecto del nivel de fibra (AF vs NF) y nivel de proteína (AP vs BP), tipo de ración y el lugar de muestreo (ciego, Ci vs colon medio, Co) en cerdos en crecimiento (100 kg PV), sobre la concentración en el medio de Bacterias totales (BT), arqueas metanogénicas hidrogenotróficas (AMH (moléculas genes 16S-rRNA/g MF) y la proporción de arqueas metanogénicas hidrogenotróficas AMH [% de las arqueas totales; ΔC(t)] y dos tipos de acetoclásticas, <i>Methanosaeta</i> spp. y <i>Methanosarcina</i>	187
Tabla 5.4.3.4. Efecto del nivel de fibra (AF vs NF) y nivel de proteína (AP vs BP) de la ración en cerdos en crecimiento (100 kg PV) sobre la concentración en el purín de bacterias totales (BT), arqueas metanogénicas hidrogenotróficas (AMH (moléculas genes 16S-rRNA/g MF) y la proporción de arqueas metanogénicas hidrogenotróficas AMH [% de las arqueas totales; ΔC(t)] y dos tipos de acetoclásticas, AMA: <i>Methanosaeta</i> spp. y <i>Methanosarcina</i>	190
Tabla 5.4.4.1. Producción acumulada de metano a 56 días post-incubación del purín artificial construido a partir de heces frescas y orina, junto a los parámetros obtenidos mediante el ajuste del modelo Gompertz a los niveles de producción de CH ₄ producido a diferentes periodos.....	191

Índice de figuras.

Figura 2.1. Fases de la conversión sincrónica del sustrato por el consorcio de especies bacterianas que participan en la síntesis de CH ₄ (Massé <i>et al.</i> , 2011; Palatsi <i>et al.</i> , 2010b)..	14
Figura 2.2. Dominio de las arqueas (Baldauf <i>et al.</i> , 2004).....	18
Figura 2.3. Morfología de las arqueas metanogénicas acetoclásticas, <i>Methanosarcina ssp.</i> y <i>Methanosaeta ssp.</i>	19
Figura 2.4. Ciclo del nitrógeno a través de las diferentes fases y niveles tróficos (Coma y Bonet, 2004).....	25
Figura 2.5. Ciclo del nitrógeno: reacciones a corto plazo (Calvet, 2007).....	26
Figura 2.6. Equilibrio dinámico del nitrógeno en la fase acuosa (Calvet, 2007).....	26
Figura 2.7. Esquema de la transformación y compuestos intermediarios que se producen durante el proceso de Nitrificación de amonio (Monteny <i>et al.</i> , 2001).....	27
Figura 2.8. Estructura y actividad bioquímica de las ureasas bacterianas (Laprotax, 2014).....	27
Figura 2.9. Proceso de Nitrificación y Desnitrificación (Hofman y Van Cleemput, 2004).....	32
Figura 4.1. Vista lateral y alzados de un módulo de cebo o engorde.....	53
Figura 4.2. Distribución de puntos en la diagonal para la medición de la velocidad.....	55
Figura 4.3. Ubicación de las campanas de flujo de aire constante (CFC) en fosa de deyecciones	56
Figura 4.4. Sistema de renovación de aire utilizado en salas de transición.....	71
Figura 5.1.1. Temperatura (°C) y humedad relativa (%) registrada en los módulos estancos (ME), precipitaciones (mm o l/m ²) registradas en el exterior de los ME y evolución de la temperatura en la fosa durante el ensayo [22 de mayo a 30 de julio 2011].....	89
Figura 5.1.2. Evolución (n = 4 módulos) de la concentración diaria de CH ₄ (a) y NH ₃ (b) registrada a diferentes tiempos de muestreo, corresponde a dos fases de engorde de cerdos.....	94
Figura 5.1.3. Evolución circadiana de la emisión de CH ₄ (a) y NH ₃ (b) de las deyecciones almacenadas en la fosa.....	95
Figura 5.2.1. Evolución de la producción de gas (a) y metano (b) [ml/g MO] a lo largo del periodo de incubación. Los niveles de producción corresponden a los valores medios de cada concentración de purín (2, 4 y 6 g MS/100g MF, respectivamente) (Interacción concentración de purín x periodo de incubación).....	106
Figura 5.2.2. Producción (ml/g MO) de gas (a) y metano (b) a lo largo del periodo de incubación. Se presentan las concentraciones registradas para las botellas suplementadas con los diferentes sustratos (Interacción tipo de sustrato x periodo de incubación).....	107
Figura 5.2.3. Enriquecimiento de CH ₄ en el gas (ml/100ml) a lo largo del periodo de incubación. Se presentan las concentraciones registradas para botellas suplementadas con co-inóculo. (Interacción; nivel de co-inóculo x periodo de incubación).....	109
Figura 5.2.4. Valores medios de pH registrados para los diferentes suplementos (Blanco, B; Paja de cereal, PCe; Pulpa de manzana, PM y Pulpa de remolacha, PR) a lo largo del periodo de incubación (0, 25 y 56 días). Los índices (a, b, c), indican diferencias significativas (P<0,05) entre sustratos y blancos. Los índices (x, y) diferencias (P<0,05) dentro de cada sustrato durante el periodo de incubación.....	111
Figura 5.2.5. Concentración (mmol/L) de ácido acético, propiónico y butírico en medios de incubación (botellas), conteniendo inóculo (purín de cerdo al 2, 4 y 6 g MS/100g MF) a diferentes periodos de incubación (0, 25 y 56 días), suplementados con heces bovinas liofilizadas (co-inóculo: 0, 5 y 10 g/100 g MS) y subproductos agrícolas (sustrato: B, Blanco; PCe, Paja de cereal; PM, Pulpa de manzana y PR, Pulpa de remolacha).....	113
Figura 5.2.6. Concentración (mmol/L) de ácidos grasos de cadena ramificada (BCFA) y ácido valérico en los medios de incubación (botellas), conteniendo inóculo (purín de cerdo al 2, 4 y 6 g MS/100g MF) a diferentes periodo de incubación (0, 25 y 56 días). Interacción:	

concentración de purín x periodo de incubación.....	114
Figura 5.2.7. Cuantificación absoluta (n° de copias/g MF) del gen 16 S rARN (BT) en las botellas que contenían las diferentes concentraciones de purín durante el proceso de incubación.....	118
Figura 5.2.8. Dendograma correspondientes a las bandas obtenidas por DGGE, representan el efecto del tiempo de incubación (0, 25 y 56 días), la adición del co-inóculo (0, 5 y 10% de heces frescas de vaca liofilizadas) y sustrato (B, Blanco; WS: paja de cereal; AP: pulpa de manzana y SBP: pulpa de remolacha) sobre la estructura poblacional de arqueas. La escala de la figura muestra la proporción de similitud.....	122
Figura 5.3.1. Evolución circadiana para la emisión de N ₂ O (a) y NH ₃ (b) en los módulos de transición.....	128
Figura 5.3.2. Evolución circadiana para la emisión de CH ₄ para el módulo de transición.....	129
Figura 5.3.3. Evolución circadiana para la emisión de NH ₃ (a) y CH ₄ (b) del aire evacuado de la fosas de deyecciones.....	129
Figura 5.4.1.1. Coeficiente de digestibilidad aparente de la PB (%) (a), cantidad de PB digerida (g/d) (b), coeficiente de digestibilidad aparente de la FND (%) (c), y la cantidad digerida de FND (g/d) (d). Como efectos de la interacción entre el contenido de PB (alta, AP vs baja, BP) y FND de la dieta (normal, NF vs alta, AF) ($P<0,01$) suministrada a cerdos en crecimiento-cebo entre las 6 y 21 semanas de edad. Por encima de cada barra, letras diferentes (a, b) indican diferencias significativas entre combinaciones de efectos ($P<0,05$). Barras de error = s.e.....	138
Figura 5.4.1.2. Excreción fecal de material seca (MS) en cerdos en crecimiento-cebo, como efecto del nivel de PB [alto, AP vs bajo, BP] (a) y/o de FND en la dieta [alta, AF vs normal, NF] (b). Por encima de cada barra, letras diferentes indican diferencias significativas ($P<0,05$) entre el nivel de PB (a, b) y/o FND (x, y). Barras de error = s.e.....	140
Figura 5.4.1.3. Densidad (kg/m ³) (a) y la conductividad eléctrica (EC) (dS/m) (b) del purín de cerdos en crecimiento-engorde (6 a 21 semanas de edad) como efectos de la interacción entre el nivel de PB dietaria (alta, AP vs baja, BP) y el nivel FND (normal, NF vs alta, AF) ($P<0,01$). Sobre cada barra, medias sin común letra (a, b) difieren ($P<0,05$). Barras de error = s.e.....	141
Figura 5.4.2.1. Evolución de la temperatura (°C) y humedad relativa (Hr, %) registrada en los Módulos Estanco [ME], junto con las precipitaciones registradas [trazos gruesos (mm)] en exterior de la nave durante la semana de muestreo de cada fase.....	147
Figura 5.4.2.2. Evolución de la concentración diaria de CH ₄ en módulos estancos, los valores corresponden a los valores medios obtenidos en cada fase del cebo.....	149
Figura 5.4.2.3. Evolución de la concentración diaria de CH ₄ en fosa de deyecciones (A: efecto del nivel de proteína y B: efecto del nivel de fibra) registrada a diferentes tiempos de muestreo en las tres fases del engorde.....	150
Figura 5.4.2.4. Evolución de la concentración diaria de NH ₃ en los módulos estancos de los animales que recibieron las mayores (A: 19,7; 17,3 y 17,5%) y menores (B: 17,2; 15,1 y 12,5%) niveles de proteína (PB) en la ración y que corresponden a las tres fases de engorde o pesos vivos objeto del presente estudio.....	158
Figura 5.4.2.5. Evolución de la concentración diaria de NH ₃ en el aire evacuado de la fosa de deyecciones. Los valores corresponden a las medias registradas en cada fase.....	159
Figura 5.4.2.6. Evolución circadiana de la concentración diaria de N ₂ O en módulos estancos, siendo A, las concentraciones detectadas en los animales que recibieron los mayores niveles de fibra (AF) y B los menores (NF), las concentraciones corresponden a los diferentes tiempos de muestreo en las tres fases del engorde analizadas.....	169
Figura 5.4.2.7. Evolución de la concentración diaria de N ₂ O en fosa de deyecciones registrada a diferentes tiempos de muestreo, correspondiente a tres fases de engorde de cerdos.....	170

Lista de abreviaturas.

Gases y derivados

CH₄	: Metano	NH₃	: Amoníaco
CO	: Monóxido de carbono	NH₄⁺	: Amonio
CO₂	: Dióxido de carbono	NO	: Óxido nítrico
H	: Hidrógeno	NO₂⁻	: Nitrito
N₂	: Nitrógeno	NO₂	: Dióxido de nitrógeno
N₂O	: Óxido nitroso	NO₃⁻	: Nitrato
NH₂	: Amino		

Términos empleados

AA	: Aminoácidos	GEI	: Gases efecto invernadero
AF	: Alta fibra	GMD	: Ganancia media diaria
AGV	: Ácidos grasos volátiles	i.e.	: Es decir
AM	: Arqueas metanogénicas	IC	: Índice de conversión
AMA	: Arqueas metanógenas acetoclásticas	IG	: Intestino grueso
AMH	: Arqueas metanógenas hidrogenotrófas	IMD	: Ingestión media diaria
AMH_{Ab}	: AMH absolutas	IMF	: Ingestión de materia fresca
AP	: Alta proteína	L an/d	: Litros/animal/día
Ash	: Cenizas	L/h	: Litros/hora
BCFA	: Ácidos grasos de cadena ramificada	LxAxA	: Largo x Ancho x Alto
BP	: Baja proteína	ME	: Módulos estancos
BT	: Bacterias totales	MF	: Materia fresca
C/N	: Relación Carbono/Nitrógeno	mg an/d	: Miligramos/animal/día
CE	: Conductividad eléctrica	MS	: Materia seca
CFC	: Campanas de flujo constante	NF	: Normal fibra
Cg	: Ciego	NSP	: Polisacáridos no amiláceos
CHO	: Carbohidratos	N-y-D	: Nitrificación y Desnitrificación
CTR	: Control	Ø	: Diámetro
CV	: Coeficiente de variación	PB	: Proteína bruta
d.e.	: Desviación estándar	PCe	: Paja de cereal
DGGE	: Electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante	PCR	: Reacción en cadena de la polimerasa
DIS	: Digestibilidad ileal estandarizada	PM	: Pulpa de manzana
ED	: Energía digestible	ppm	: Partes por millón
EE	: Extracto etéreo	PR	: Pulpa de remolacha
EGD	: Espesor de grasa dorsal	Pur10	: Purín original al 10%MS
EM	: Energía metabolizable	PV	: Pesos vivo
Eq.	: Equivalentes	PV^{0,75}	: Peso metabólico
FAD	: Fibra ácido detergente	PVC	: Polietileno
FB	: Fibra bruta	qPCR	: PCR cuantitativa
FND	: Fibra neutro detergente	s.e.	: Error estándar
g an/d	: Gramos/animal/día		

RESUM: En el present treball s'avaluà l'emissió de NH₃ i gasos amb efecte hivernacle (GEH: CH₄ i N₂O) en porc, en engreix i en les condicions emprades comercials d'explotació analitzant a l'hora l'efecte que, sobre l'esmentada emissió, exerceixen el nivell de proteïna bruta i fibra neutra detergent (FND) de la ració. En la memòria es presenten 4 assajos, en el primer d'ells es desenvolupà un procediment metodològic de quantificació, mostreig i anàlisis dels gasos diferenciant l'emissió entèrica (pròpia de l'animal) de la procedent de les dejeccions. Per això es determinà l'emissió procedent dels mòduls estancs (ME), quantificant el flux i la concentració dels gasos a l'entrada i sortida de cada ME. L'emissió procedent de la fossa (Puri) es determinà *in situ* a partir de càmeres de flux constant (CFC) que aïllaven una àrea determinada de superfície del purí. Els nivells d'emissió registrats [g/porc/d] als 60 i 97 kg de pes viu (PV) van ser per l'NH₃ i el CH₄ de 7,02-10,1 i 15,7-11,6 respectivament pels pesos esmentats, emissions que es situaren dins dels marges fisiològics establerts. En el segon assaig es va avaluar *in vitro* el potencial de producció total de metà (a 56 dies d'incubació) d'una mostra de purí (metanització), analitzant l'efecte de la dilució del purí (2, 4 y 6% de la MS), de la suplementació amb carbohidrats estructurals (palla i polpa de poma i remolatxa) o una font exògena d'arquees. La concentració mitjana de purí (4% MS) mostrà la major producció potencial de CH₄ (ml/gMO); que va esser deprimida per la polpa de remolatxa (88,5) mentre que la palla i la polpa de poma la van millorar (132,3 y 138,6) sempre en relació al control (124,2). Les femtes de vaquí com a co- inòcul o font d'arquees no va millorar la producció de CH₄. Els títols d'arquees metanogèniques hidrogenotròfiques (AMH) i bacteris totals (BT) es van deprimir significativament durant la digestió del purí i els títols de AMH es van correlacionar negativament amb el CH₄ generat. En el tercer assaig es va avaluar l'emissió en porcs al final de la fase de transició (≈ 22 kg PV) aplicant la metodologia descrita anteriorment. Els registres d'emissió [g/porc/d] van ser de 3,2 per el CH₄; 0,42 per l'NH₃ i 0,043 per el N₂O, d'aquestes quantitats la contribució a l'emissió corresponent al purí va ser de 35, 1,7 i 0% per les emissions de CH₄, NH₃ y N₂O, respectivament. En el quart assaig es va avaluar l'efecte del nivell de la PB i la FND de la ració sobre l'emissió de GEI i NH₃, els nivells d'emissió es relacionaren amb els paràmetres productius, la digestibilitat i la microbiologia digestiva així com amb els paràmetres de fermentació al tracte ceco-colònic. Els nivells de PB i FND utilitzats no van modificar la ingestió ni els ritmes de creixement. L'emissió total [g/porc/d] de GEH i NH₃ durant el període d'engreix (dels 33 als 102 kg PV) mostraren una relació positiva amb el pes/desenvolupament dels porcs (2,5 a 7,6 gCH₄, 1,8 a 8,5 gNH₃ i 0,052 a 1,12 gN₂O), encara que l'esmentada relació no fou proporcional. Amb l'edat, la contribució de las dejeccions a la emissió total varià entre 3,2 a 17, de 1,2 a 0,18 i del 0,92 a 0,05% en el cas del CH₄, NH₃ i N₂O, respectivament. L'emissió de CH₄ mostrà una relació positiva amb el nivell de FND i el de NH₃ amb la de PB. La emissió de N₂O fou també alterada pels components de la ració, la PB redueix llur emissió i la FND la incrementà però només al final de l'engreix. El pH i la concentració de N amoniacal incrementaren durant el trànsit del quilo a través del tracte ceco-colònic mentre que es va reduir la concentració d'àcids grassos volàtils (AGV). L'aportament dietètic de fibra incrementà el pH i va reduir les taxes de N-NH₃ i AGV en el quilo en el seu trànsit intestinal. Les concentracions absolutes de BT i AMH així com les proporcions relatives de AMH i de *Methanosaeta* ssp. al quilo incrementaren al seu pas per l'intestí gros. BT, AMH i *Methanosarcina* ssp. van mostrar llurs majors concentracions en el quilo dels porcs que havien ingerit les racions amb una major proporció de PB, menor de fibra i els seus títols no van guardar relació amb el metà emès.

RESUMEN: En el presente trabajo se evaluó la emisión de NH_3 y gases con efecto invernadero (GEI: CH_4 y N_2O) en cerdos en cebo y en condiciones comerciales de explotación, analizando a su vez el efecto que sobre dicha emisión ejercen el nivel de PB y FND de la ración. En la memoria se presentan 4 ensayos, en el primero de ellos se desarrolló un procedimiento metodológico de cuantificación, muestreo y análisis de los gases diferenciando la emisión entérica (propia del animal) de la procedente de las deyecciones. Para ello se determinó la emisión procedente de los módulos estancos (ME), cuantificando el flujo y la concentración de los gases a la entrada y salida de cada ME. La emisión procedente de la fosa (Purín) se determinó *in situ* a partir de cámaras de flujo constante (CFC) que aislaban un área determinada de superficie del purín. Los niveles de emisión registrados [g/cerdo/d] a los 60 y 97 kg de peso vivo (PV) fueron para el NH_3 y el CH_4 de 7,02 y 10,1 y 15,7 y 11,6 respectivamente, emisiones que se situaron dentro de los rangos fisiológicos esperados. En el segundo ensayo se evaluó *in vitro* el potencial de producción total de metano (a 56 días de incubación) de una muestra de purín (metanización), analizando el efecto de la dilución del purín (2, 4 y 6% de la MS), la suplementación con carbohidratos estructurales (paja y pulpa de manzana y remolacha) o una fuente exógena de arqueas. La concentración intermedia de purín (4% MS) mostró la mayor producción potencial de CH_4 (ml/gMO); que fue deprimida por la pulpa de remolacha (88,5), mientras que paja y pulpa de manzana la mejoraron (132,3 y 138,6) siempre en relación al control (124,2). Las heces de vacuno como co-inóculo o fuente de arqueas no mejoraron la producción de CH_4 . Los títulos de Arqueas Metanogénicas Hidrogenotróficas (AMH) y bacterias totales (BT) se deprimieron significativamente durante la digestión del purín y los títulos de AM se correlacionaron negativamente con el CH_4 generado. En el tercer ensayo, se evaluó la emisión en cerdos al final de la fase de transición (\approx 22 kg PV) aplicando la metodología descrita. Los registros de emisión [g/cerdo/d] fueron de 3,2 para el CH_4 , 0,42 el NH_3 y 0,043 el N_2O , de estas cantidades la contribución a la emisión correspondiente al purín fue del 35, 1,7 y 0% para las emisiones de CH_4 , NH_3 y N_2O , respectivamente. En el cuarto ensayo se evaluó el efecto del nivel de la PB y la FND en la ración sobre la emisión de GEI y NH_3 , los niveles de emisión se relacionaron con los parámetros productivos, la digestibilidad y microbiología digestiva así como con los parámetros de fermentación en el tracto ceco-colónico. Los niveles de PB y FND utilizados no modificaron la ingestión ni los ritmos de crecimiento. La emisión total [g/cerdo/d] de GEI y NH_3 durante el periodo de cebo (de los 33 a los 102 kgPV) mostraron una relación positiva con el peso de los animales (2,5 a 7,6 g CH_4 , 1,8 a 8,5 g NH_3 y 0,052 a 1,12 g N_2O), aunque dicha relación no fue proporcional. Con la edad, la contribución de las deyecciones a la emisión total varió entre 3,2 a 17, del 1,2 a 0,18 y del 0,92 a 0,05% para el caso del CH_4 , NH_3 y N_2O , respectivamente. La emisión de CH_4 mostró una relación positiva con el nivel de FND y el NH_3 con la de PB. La emisión de N_2O fue también alterada por los componentes de la ración, la PB redujo su emisión y la FND la acrecentó, pero sólo en al final del cebo. El pH y la concentración de N amoniacal incrementaron con el tránsito del quilo a través del tracto ceco-colónico mientras que se redujo la concentración de AGV. El aporte dietético de fibra incrementó el pH y redujo las tasas de N- NH_3 y AGV en el quilo en su tránsito intestinal. Las concentraciones absolutas de BT y AMH y las proporciones relativas de AMH y de *Methanosaeta* ssp. en el quilo incrementaron a su paso por el intestino grueso. BT, AMH y *Methanosarcina* ssp. mostraron sus mayores concentraciones en el quilo de aquellos animales que habían ingerido las raciones con mayor proporción de PB, menor de fibra y sus títulos no guardaron relación con el CH_4 emitido.

SUMMARY: The present study assessed the emission of NH₃ and greenhouse gases (GHGs: CH₄ and N₂O) in growing pigs under commercial operating conditions, analyzing the effect of CP and NDF levels in diet on the emissions of aforementioned gases. Presented thesis contains four trials, in the first one methodological procedure of quantification, sampling and analysis of the gases from the different sources (enteric [emitted from the animal] and slurry) was developed. These emissions were determined from sealed modules (ME), controlling the flow and quantifying the concentration of the gases at the entrance and exit of each module. The emissions from the pits (slurries) were determined on-site from constant flow chambers (CFC) that isolated a specific surface area of the slurry. NH₃ and CH₄ emission levels [g/pig/d] were 7,02 and 10,1 for 60 kg LW pigs whereas for 97 kg LW pigs were 15,7 and 11,6, emissions were within the expected physiological ranges. In the second trial *in vitro* potential of methane production (up to 56 days of incubation) of liquid slurry (anaerobic digestion) was evaluated and the effect of the slurry dilution (2, 4, and 6% of the DM) supplemented with structural carbohydrates (straw, apple and sugar beet pulp) or an exogenous source of archaea over methane production was analyzed as well. The intermediate concentration of the slurry (4% DM) showed greater potential of methane production (ml/g OM); sugar beet pulp depressed (88,5) while straw and apple pulp improved methane production (132,3 and 138,6) in relation to the control (124,2). The faeces of beef cattle used as co-inoculum or source of archaea did not improve the methane production. The abundance of Hydrogenotrophic Methanogenic Archaea (HMA) and total bacteria (TB) is significantly depressed during digestion of slurry and abundances of HMA were negatively correlated with the generated CH₄. In the third trial, the emissions from piglets at the end of transition phase (\approx 22 kg live weight) were assessed by applying the described methodology. The recorded enteric emissions [g/pig/d] were 3,2 for CH₄, 0,42 for NH₃ and 0,043 for N₂O, whereas the emissions from the slurry were 35, 1,7, and 0% for NH₃, CH₄ and N₂O, respectively. In the fourth trial, the effect of CP and NDF levels in the rations were evaluated over the emission of greenhouse gases and NH₃, emission levels were linked to productive parameters, digestibility and digestive tract microbiology as fermentation parameters of the cecum-colonic tract. The used CP and NDF levels did not affect the ingestion or the growth rate. Total emission [g/pig/d] of greenhouse gases and NH₃ during the growing-finishing (from 33 to 102 kg BW) showed a positive relationship with the weight of the animal (2,5 to 7,6 g CH₄; 1,8 to 8,5 g NH₃ and 0,052 to 1,12 g N₂O), although this relationship was not proportional. The contribution of the manure to the total emission changed with age, 3,2 to 17; 1,2 to 0,18 and 0,92 to 0,05% in the case of CH₄, NH₃ and N₂O, respectively. A positive relation was established between methane emission and the NDF level as well as NH₃ emission and the CP level in the diet. The emission of N₂O was also altered by the components of the ration; the augment in CP level decreased its emission whereas N₂O emissions increased by augment in NDF level just at the end of growing-finishing. The pH and N-ammonia concentration increased in the digesta transit through the cecum-colonic tract while the concentration of VFA reduced. The dietary intake of fiber increased the pH and reduced N-NH₃ and VFA in the colon digesta in intestinal transit. The absolute abundance of total bacteria and HMA and the relative proportions of HMA and *Methanosaeta* *ssp.* in the digesta increased as it pass through the large intestine. Total bacteria, HMA, and *Methanosarcina* *ssp.* showed their highest concentrations in the digesta of those animals that had ingested rations with greater proportion of CP, and lower NDF whereas their titers were not related to emitted CH₄.

I. INTRODUCCIÓN Y PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL

I. INTRODUCCIÓN Y PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL.

La producción ganadera en España ha sufrido un proceso intenso de especialización y concentración. Dicho proceso ha conllevado importantes ventajas en la eficiencia del proceso de producción, pero también tiene potenciales inconvenientes, entre ellos, el más importante ha sido la alteración medioambiental que dicha concentración de animales puede suponer. La contaminación medioambiental derivada de las explotaciones porcinas debe situarse a dos niveles: la del suelo (orgánica o mineral) y la emisión de gases. En la presente memoria nos centraremos en la contaminación gaseosa y concretamente en la emisión de NH_3 y gases con efecto invernadero [i.e. metano (CH_4) y óxido nitroso (N_2O)].

La emisión de amoníaco es tóxica para la actividad humana (>15 ppm) y contribuye de forma significativa a la eutrofización del agua y acidificación del suelo y agua, y aunque los autores de la presente memoria no han podido encontrar datos referentes a nuestro país, en Holanda el 46% de la acidificación del medio procede de la liberación de amoníaco, cuyo origen mayoritario reside en los procesos agro-ganaderos (92%, Heij y Schneider, 1995). Por otra parte, una deficiente aplicación de NH_3 a suelos pobres en materia orgánica provoca un excesivo enriquecimiento en N (Fangmeier *et al.*, 1994), actuando como reservorio para una potencial emisión de óxido nitroso (N_2O ; Mosier *et al.*, 1998)

El óxido nitroso (N_2O) y el metano (CH_4) son gases con una potente actividad radiativa que les confieren una elevada capacidad de absorción de la energía infrarroja. Por ello, contribuyen al calentamiento global y en una proporción importante se emiten a la atmósfera debido a actividades antropogénicas. La actividad radiativa de estos compuestos es, respectivamente, 298 y 25 veces la del CO_2 en un horizonte temporal de 100 años (Solomon *et al.*, 2007). Por otra parte, el óxido nitroso contribuye de forma manifiesta a la reducción de la capa de ozono (Olivier *et al.*, 1998).

La producción global de CH_4 (MT: 10^{12} g Millones de toneladas) se situaría en torno a 535 MT, 160 de las cuales se producen de forma natural y 375 derivan de la actividad antropogénica (Houghton *et al.*, 1996). A nivel global la ganadería es responsable del 23% de las emisiones de origen antropogénico (Khalil, 2000) y en España, dicha contribución supera el 35% (Cambra-López *et al.*, 2008). El CH_4 es un producto de la fermentación anaerobia de carbohidratos vegetales que por su escasa solubilidad se volatiliza rápidamente, en rumiantes se libera por eructación mientras que en fermentadores post-gástricos por flatulencias tras su producción en rumen e intestino grueso, respectivamente, en el primer caso su producción depende fundamentalmente del consumo de fibra

(Kirchgessner *et al.*, 1991), mientras que en el segundo su producción en porcino se ha relacionado con la ingestión de energía digestible (1,2% ED; Christensen y Torbeck, 1987). Así, los diferentes compartimentos de fermentación digestivos [rumen /especies rumiantes, colón (équidos, cerdos) o ciego (conejo)] comparten mecanismos de fermentación, entre ellos la generación de actividad reductora (H_2) durante la fermentación de los carbohidratos estructurales. Esta actividad reductora, es eliminada del compartimento de fermentación por diversos mecanismos, uno de los más importantes es la síntesis de CH_4 por parte de las arqueas metanogénicas.

La formación de CH_4 no se restringe al rumen o al intestino grueso (IG), sino que los procesos de fermentación y producción continúan en los purines, siendo en este caso los factores determinantes para la síntesis de CH_4 : la composición del purín, las condiciones de almacenamiento y la presencia de compuestos inhibidores (Blanes-Vidal *et al.*, 2008; Zeeman *et al.*, 1991), es decir, en las deyecciones, si las condiciones de fermentación son favorables se inicia un proceso espontáneo de formación de CH_4 o “metanización” del sustrato, dicho proceso ha sido descrito en diversos biotopos naturales (i.e. lagos, pantanos, arrozales, etc.), pero para la presente memoria cobra especial relevancia las condiciones y los niveles de emisión que se producen durante la gestión de las deyecciones (Monteny *et al.*, 2001). En porcino, la producción entérica o digestiva se sitúa en torno al 50% (1,5 kg CH_4 an/año, Van Amstel *et al.*, 1993) de la producción total (3,3 kg CH_4 an/año; Monteny *et al.*, 2001), aunque en la literatura existente se pueden encontrar mayores tasas de emisión y más variables (3,9-21 kg CH_4 an/año; Groot *et al.*, 1997). Las tasas de emisión de metano en ganado porcino son siempre inferiores a las descritas en rumiantes (i.e. 84 a 123 y 102 a 117 kg CH_4 an/año en bovino lechero y cebo de terneros, respectivamente, Monteny *et al.*, 2001), aunque el impacto de las emisiones gaseosas deben ser referidas a una cabaña que se ajustó en noviembre del año 2013 a 5,7; 16,12 y 2,61 millones de cabezas de bovino; corderos y caprino, respectivamente (MARM, 2013bc), frente a los 25,5 millones de cerdos (MARM, 2013a).

En contraste con la producción de metano, la producción entérica de N_2O es mínima y heterogénea. En los purines el N_2O puede ser generado a partir de diversos compuestos, los más importantes la urea y el ácido úrico, que deben ser previamente transformados a amonio (NH_4^+). El amonio, en condiciones aerobias y en la presencia de ciertas bacterias nitrificantes (i.e. *Nitrosomas* ssp.; *Nitrobacter* ssp.) es transformado a nitrato (1: NO_3^-) para ser posteriormente desnitrificado (2), hasta la liberación final de N_2 (Monteny *et al.*, 2001). En condiciones óptimas en el proceso de Nitrificación del N amoniacal ($NH_3 \leftrightarrow NH_4^+$) la producción de N_2O es mínima, incrementado cuando inciden diversos factores limitantes, destacar la presencia de ciertas especies de bacterias

heterotróficas, la concentración de oxígeno, amoníaco y materia orgánica fácilmente oxidable (Firestone y Davidson, 1989). La producción de N₂O se restringe al purín/estiércol ya que no se ha podido describir su síntesis a nivel entérico.

En términos globales la producción de N₂O es de 17,7 MT, de ellas se emiten de forma natural 9,6; 8,1 MT se originan por la actividad antropogénica, y de ellas 6,2 MT son producidas por la ganadería (Kroeze *et al.*, 1999). Es cierto que la producción de N₂O es muy inferior a la de metano, sin embargo, su superior actividad radiativa hace que en términos de equivalentes CO₂ (Eq. CO₂) el impacto del N₂O pueda ser tan importante como el del metano.

En numerosos trabajos se ha pretendido reducir la polución medioambiental incidiendo en la reducción de aquellos compuestos más importantes y nocivos para la actividad humana, en el caso de los purines de cerdo la emisión de amoníaco y olores desagradables, sin embargo, el impacto medioambiental de los gases involucrados en el calentamiento global (i.e. efecto invernadero) y sus interacciones cobran cada día una mayor relevancia (Kroeze, 1998).

El amoníaco en los purines se origina a partir de la urea urinaria siendo mínima la cantidad que procede de la proteína fecal (Jongbloed y Lenis, 1992). El N fecal es incorporado en la proteína microbiana, de descomposición lenta, mientras que el N urinario es transformado rápidamente a NH₃ y liberado. En general, pero puede considerarse que más de la mitad del N ingerido (orina más heces) es desperdiciado en forma de N amoniacal (Cahn *et al.*, 1998a; Van der Peet-Schwering *et al.*, 1999).

Las pérdidas de N en forma de amoníaco pueden reducirse mediante diferentes procedimientos, entre ellos, reduciendo la excreción de N y optimizando las condiciones de almacenamiento de los purines. En el primer caso, una reducción en el contenido de proteína bruta (PB) de la ración permite reducir drásticamente la excreción urinaria de N y con ello la emisión de amoníaco. Kay y Lee (1997) demostraron una reducción en las emisiones de amoníaco de 9,8% por cada unidad porcentual de reducción de la PB en la ración. Estos datos que fueron posteriormente confirmados por otros autores, [Canh *et al.* (1998a) y Latimier y Dourmant (1993)] con niveles de reducción de amoníaco por unidad de PB en la ración que variaron entre el 8,3 y 12,5%. No obstante, la reducción de PB en la ración tiene un coste, bien por una reducción en los rendimiento productivos o bien encareciendo el coste de la ración dada la necesidad de incrementar la calidad de la PB, mejorando el perfil de aminoácidos (Canh *et al.*, 1998a). Una segunda estrategia para reducir las pérdidas urinarias de N es vehicular la urea plasmática al intestino grueso. Esto es, la fermentación bacteriana en el colon permite fijar N no proteico y por tanto la adición de fibra no digestible, pero potencialmente fermentable (hidratos de

carbono no amiláceos) permite incrementar la actividad fermentativa en el intestino grueso y fijar con ello la urea plasmática a costa de reducir su excreción renal (Canh *et al.*, 1997). Bakker (1996) demostró un incremento en la concentración y excreción total de N en heces en detrimento de las pérdidas urinarias, cuando el almidón de la dieta fue sustituido por diferentes tipos de fibra fermentable. En el mismo sentido Kreuzer y Machmüller (1993) cuantificaron dicha relación y describieron que la reducción en la excreción de N urinario fue del 20 a 28% al incrementar los niveles dietéticos de hidratos de carbono no amiláceos del 14-31%, respectivamente. Cahn *et al.* (1998d), confirmaron este efecto y demostraron además que este efecto estaría modulado por el tipo de fibra fermentable.

No obstante, al incrementar la fermentación microbiana en el intestino grueso lo hacen también la concentración de AGV y la emisión de CH₄. Jørgensen (2007) cuantificó estas pérdidas en dos fases fisiológicas: cebo y lactación; y describió una relación positiva entre la inclusión de fibra y la producción de CH₄. Incrementos en la producción de metano que variaron del 1,3% de la ED en cebo al 3,3% en cerdas no lactantes. Citar también que el efecto de la mayor actividad fermentativa inducida por la presencia de fibra sobre la emisión de metano no se restringió a la emisión entérica, sino que dicho proceso tuvo su continuidad en el almacenamiento de purines en granja (Blanes-Vidal *et al.*, 2008) y en su aplicación a los cultivos (Sherlock *et al.*, 2002).

En relación al segundo punto (la reducción de NH₃ durante el almacenamiento de purines en granja) se han desarrollado diferentes estrategias, entre ellas la utilización de cubiertas, que al reducir la superficie limitan considerablemente dicha emisión (50-90%; Portejoie *et al.*, 2003), creando como efecto secundario un incremento en la anaerobiosis, susceptible para el desarrollo de las especies metanogénicas (Williams y Nigro, 1997).

La superficie de emisión de NH₃ puede ser también modificada por el tratamiento de los purines, reduciéndola mediante su dilución (Phillips *et al.*, 1999) o incrementándola mediante la utilización de diferentes sustratos sólidos (i.e. paja de cereal, serrín: European Commission, 2003; Philippe *et al.*, 2007ab), variando con el material del emparrillado (Philippe *et al.*, 2011b); estos efectos van a tener un resultado diferencial sobre la emisión de los gases objetos del presente estudio. Al limitar la superficie de emisión se reducen las pérdidas de amoníaco (European Commission, 2003), pero otra vez se incrementaría los niveles de anaerobiosis y por tanto las condiciones potenciales para la producción y emisión de CH₄.

En relación a la emisión de N_2O , existen muy pocos trabajos en los que se analice el efecto de manipulaciones en la ración sobre su emisión (Cardenas *et al.*, 2007) y los que existen en nuestro país, se centran en la aplicación al suelo de estiércol de ganado bovino sometido a diferentes estrategias nutritivas (Arriaga *et al.*, 2010). En general, se acepta que una reducción en la concentración de N amoniacal y materia orgánica (i.e. AGV) en las deyecciones reduce la emisión de N_2O durante el almacenamiento y aplicación al suelo de las deyecciones (Cardenas *et al.*, 2007), por ello una reducción en el contenido de proteína bruta de la ración va a reducir la emisión de amoníaco, pero también la emisión de óxido nitroso.

No obstante, cuando la emisión de amoníaco se reduce a costa de incrementar el contenido de fibra digestible de la ración lo hace también el contenido en MO de las deyecciones (Canh *et al.*, 1998d), incluyendo la concentración de AGV y consecuentemente ello podría incrementar la emisión de N_2O . La relación positiva entre la presencia de C-soluble en las deyecciones y el incremento en la emisión fue cuestionado por Scholefield *et al.* (1997), quienes demostraron que la adición de C-soluble a las deyecciones redujo la tasa de emisión N_2O / N_2 dado que ello estimuló la transformación de N_2O como aceptor de electrones en las poblaciones desnitrificantes, produciendo N_2 (de Wever *et al.*, 2002).

De lo anteriormente expuesto se deduce, i) la necesidad cuantificar y registrar sus niveles de producción en las diferentes fases fisiológicas, ii) diseñar estrategias encaminadas a mitigar dichas emisiones y iii) es necesario además considerar la emisión gaseosa en su conjunto, evitando aquellos procedimientos que al reducir la emisión de uno de ellos pueda incrementar la del resto.

En esta memoria se pretende considerar, tanto la emisión de aquellos gases nocivos o molestos para la actividad humana (NH_3), como aquellos que contribuyen al calentamiento global (CH_4 y N_2O) y cuya reducción fue ya propuesta en el marco del protocolo de Kyoto en 1997 y que entró en vigor el 16 de febrero del 2005 (UNFCCC, 2007).

I. Introducción y planteamiento experimental.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Emisión de gases tóxicos en ganadería porcina: Amoníaco (NH₃) y gases con efecto invernadero [GEI: metano (CH₄) y óxido nitroso (N₂O)].

Los procesos de fermentación que se producen en diferentes tramos del tracto digestivo de los animales de abasto (retículo-rumen y el tracto ceco-colónico) y posteriormente en sus deyecciones (i.e. heces, orina, agua y residuos de alimentos) van a producirse ciertas emisiones gaseosas que adquieren especial relevancia según la especie y el tipo de manejo al que sean sometidos los animales (Dubeňová *et al.*, 2014; Samer, 2013). Estos gases podemos diferenciarlos en tres grupos, molestos para la actividad humana (i.e. Putresceínas, Danilevici *et al.*, 2009), tóxicos (i.e. CH₄ y N₂O) y otros que incluirían ambos componentes (i.e. NH₃). Entre las diversas emisiones gaseosas, en esta memoria nos centraremos en la emisión de aquellos gases que siendo tóxicos adquieren una especial relevancia debido a su emisión cuantitativa.

La toxicidad de CH₄ y el N₂O reside en su elevada capacidad radiativa (respectivamente, 25 y 298 veces la del CO₂ para un horizonte de 100 años, Solomon *et al.*, 2007) y por tanto poseen un marcado efecto invernadero (GEI: gases con efecto invernadero) y bajo esta perspectiva serán analizados.

El amoníaco es un gas tóxico (Jarret *et al.*, 2011; Vedrenne *et al.*, 2008), agresivo frente a las mucosas celulares y cuyos niveles, regulados legalmente, en las explotaciones no pueden exceder a las 50 ppm (Babot y Revuelta, 2009; Banhazi *et al.*, 2008), presenta además una importante relación con los GEI, concretamente con la emisión de N₂O. Esta relación podemos situarla a dos niveles, en la transformación que se produce NH₃↔N₂O, principalmente en la troposfera por la presencia de emisiones no ionizantes (NH₃ + O → NH₂ + OH; NH₃ + OH → NH₂ + H₂O; NH₂+NO₂ → N₂O + H₂O; 2NH₃ + 2O₂ → N₂O + 3H₂O; NH₂ + HO₂ → NH₃ + O₂; Dentener y Crutzen, 1994; Gang, 2002) (NH₃ + O₂ → NO + H₂O; NH₃ + NO₂ → N₂O + H₂O: Sharma *et al.*, 2011) y por ser uno de los precursores necesarios, y cuyas concentraciones en el purín están directamente relacionadas con los niveles de emisión y/o síntesis de N₂O (Monteny *et al.*, 2001). Por tanto, en la presente memoria se considerará la emisión de NH₃ relacionada directamente con la toxicidad de los GEI.

2.1.1. Emisión de metano (CH₄).

El metano tiene una capacidad radiativa (emisión de calor cuando es sometido a la radiación solar) de 25 veces más potencia que el CO₂ (Solomon *et al.*, 2007), y es considerado por la UNFCCC (2005) como el gas que más contribuyente al calentamiento global después del CO₂. La producción

global de CH₄ se situaría en torno a 535 MT, 160 de las cuales se producen de forma natural y 375 derivan de la actividad antropogénica (Houghton *et al.*, 1996). Además las proyecciones a partir de la modelización de los niveles registrados nos situarían en niveles de incremento, en el 2030, próximos al 28 %. Es cierto, no obstante, que las medidas climatológicas a nivel global son complejas por lo que están sujetas a una elevada variabilidad, especialmente en el caso de CH₄ donde podemos encontrar trabajos y autores que incluso niegan o minimizan la existencia de dicha contribución argumentando que la estimación de su capacidad radiativa obedecería a un error artefactual (Flood, 2011).

A nivel global la ganadería es responsable del 23% de las emisiones de origen antropogénico (Khalil, 2000) y en España, dicha contribución podría alcanzar el 35% (Cambra-López *et al.*, 2008). La generación de CH₄ ocurre en hábitats naturales donde se produce una degradación de la MO en condiciones de anaerobiosis, son ejemplos: los sedimentos oceánicos, lagos, ríos, pantanos y también en los compartimentos de fermentación, tanto de los animales superiores (mamíferos: rumen, tracto ceco-colónico) como en los insectos (i.e. termitas). La actividad antropogénica va a ser una fuente generadora de metano a través de diferentes procesos; tales como la cría de animales (fundamentalmente rumiantes; Braun, 2007), cultivos (i.e. arrozales, Hoglund-Isaksson, 2012; Moss, 2000; Smakgahn, 2011) y la contribución de ciertas construcciones como vertederos, fosas sépticas, rellenos sanitarios, etc. (IPPC, 2007; WWF, 2013).

La producción de CH₄ está ligada a la fermentación anaerobia de diferentes sustratos, básicamente carbohidratos que constituyen la fracción más importante de las raciones destinadas a los animales domésticos, también para el hombre. Estos carbohidratos, a nivel nutricional hemos de dividirlos en dos tipos, los carbohidratos estructurales (fibras: celulosa, hemicelulosas y lignina) y carbohidratos no estructurales (almidón, fundamentalmente). Los animales superiores tenemos el perfil enzimático necesario para digerir los azúcares no estructurales, sin embargo, no podemos utilizar o digerir la fibra (Saengkerdsut y Ricke, 2014; Van Soest, 1994). La fibra, en diferente medida, sólo podrá ser fermentada por los microorganismos celulíticos que se desarrollan simbióticamente en los compartimentos de fermentación donde se dan las condiciones idóneas para el crecimiento de dichas poblaciones (Varel y Yen, 1997). La población microbiana fermenta las hexosas y genera como productos de excreción ácidos grasos de cadena corta o volátiles (AGV = acético, propiónico y butírico), ácido láctico (Bach Knudsen, 2010), algunos gases (CO₂, H₂ y CH₄), urea (NH₃, Cao *et al.*, 2012) y calor (Jørgensen *et al.*, 2011).

Los AGV originados son utilizados por el animal hospedador como fuente de energía (Varel y Yen, 1997), contribuyendo a sus necesidades energéticas, mientras que los gases emitidos - CO₂ y

CH₄ - corresponden a pérdidas energéticas irreversibles (Jørgensen *et al.*, 2011), aunque ciertas especies microbianas son capaces de reducir el CO₂ a CH₄ a partir del H₂ generado en exceso durante los procesos de fermentación anaerobia (Cao *et al.*, 2012).

El CH₄ es un gas con baja solubilidad en agua, muy volátil (Monteny *et al.*, 2001), y en los fermentadores pre-gástricos este gas se liberará por eructación mientras que en fermentadores post-gástricos por flatulencias. Su producción depende fundamentalmente del consumo de fibra (Kirchgessner *et al.*, 1991), aunque en los fermentadores post-gástricos se ha relacionado también con la ingestión de energía total y ello es así porque el contenido y composición de carbohidratos estructurales en la ración de estas especies es baja y constante (Christensen y Torbeck, 1987; Franz *et al.*, 2011).

Este proceso de fermentación puede continuar en las deyecciones y la intensidad de la emisión dependerá del mantenimiento de las condiciones de fermentación, básicamente de los niveles de anaerobiosis y por ello existirá una relación directa entre el tipo de manejo y los niveles de emisión, así los tiempos de almacenamiento (Monteny *et al.*, 2001) o inversamente, la frecuencia de recogida en el interior de los alojamientos modificarán los niveles de emisión de CH₄ (Haeussermann *et al.*, 2006; Samer, 2013). La producción de CH₄ será escasa o nula durante las primeras días/semanas de almacenamiento (Blanes-Vidal *et al.*, 2008; Dinuccio *et al.*, 2008), incrementará con el contenido de MO en las excretas (Blanes-Vidal *et al.*, 2008) y se reducirá con la presencia de inhibidores (i.e. sustancias alógenas: Zeeman, 1991). La emisión de CH₄ no se restringe a la fase de almacenamiento de las deyecciones y tiene su continuidad durante la propia aplicación del purín a los cultivos (Samer, 2013; Sherlock *et al.*, 2002).

2.1.1.1. Síntesis de CH₄.

Por todo ello, en los procesos de producción de CH₄ debemos distinguir un doble origen, i) el entérico, en el cual el consorcio microbiano que participa directa o indirectamente en la producción de CH₄ va a interactuar con el sistema digestivo del animal hospedador, mediante la incorporación a la digesta de diversas sustancias (H₂O, NH₄) o eliminándolos mediante procesos de absorción (NH₄, AGV). Esta interacción no va a ocurrir cuando los procesos de síntesis ocurren ii) fuera del organismo (i.e. durante el almacenamiento o aplicación de las deyecciones). En el primer caso la absorción de sustratos (AGV) utilizables por el consorcio metanogénico limitará los procesos de síntesis de metano, que a su vez mostrará diferentes intensidades según el compartimento de fermentación en el cual se produzcan dichos procesos de fermentación (Jørgensen *et al.*, 1997). En el segundo podemos asistir a

una degradación completa de la MO con la consiguiente síntesis de CH_4 . Cuando dicha degradación es completa y el sustrato es totalmente “metanizado” podemos distinguir una serie secuencial de procesos químicos (algunos de los cuales son minoritarios en la producción “*in vivo*”) en cada una de los cuales se involucran diversas poblaciones microbianas que actúan sincrónicamente. En dicha secuencia se han diferenciado cuatro fases (Massé *et al.*, 2011) que se presentan esquematizadas en la Figura 2.1. El proceso de fermentación se iniciaría con, I) **Hidrólisis** enzimática [1] de los compuestos más complejos (i.e. proteínas e hidratos de carbono, lípidos); II) **Acidogénesis**, degradación [2] de diferentes compuestos (i.e. hexosas) hasta AGV, H_2 y CO_2 ; (III) **Acetogénesis**, síntesis de acetato [3]; los AGV son transformados a acético, en esta fase adquieren especial relevancia las bacterias homoacetogénicas [4] generando acetato a partir de CO_2 y H_2 ; y finalmente (IV) metanogénesis, el ácido acético es reducido a CH_4 y CO_2 por las *Metanógenos acetoclásticos* [5] y las arqueas hidrogenotróficas son capaces de reducir el CO_2 a CH_4 utilizando el H_2 del medio [6].

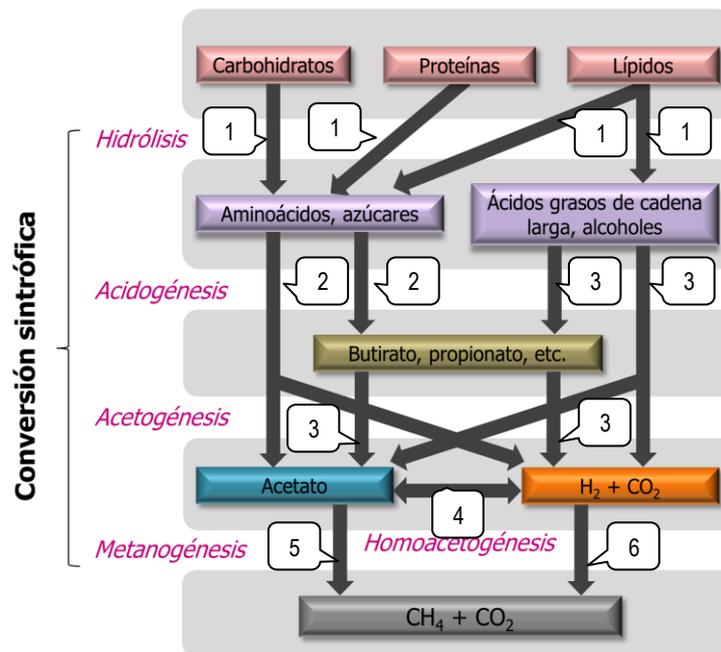


Figura 2.1. Fases de la conversión sincrónica del sustrato por el consorcio de especies bacterianas que participan en la síntesis de CH_4 (Massé *et al.*, 2011; Palatsi *et al.*, 2010b).

2.1.1.1.1. Síntesis de CH_4 : Fase (I) Hidrólisis.

Los sustratos orgánicos se componen de tres tipos básicos de macromoléculas: hidratos de carbono, proteínas y lípidos (Tabla 2.1), estas moléculas son utilizadas por los microorganismos tras su hidrólisis previa a compuestos solubles, capaces de atravesar la membrana celular, este proceso de hidrólisis se lleva a cabo por complejos enzimáticos extracelulares bacterianos (Schlüter, 2008), y

constituye el primer paso para la fermentación de sustratos complejos como lo son los componentes mayoritarios de la digesta. Esta etapa, puede ser una de las limitantes en el proceso de fermentación, cuando la digesta contiene un elevado contenido en sólidos (Campos, 2001; Palatsi, 2010a) poco biodegradables (i.e. Ligninas, FAD; Vedrenne *et al.*, 2008).

Tabla 2.1. Bacterias hidrolíticas que participan en la digestión anaerobia de los diferentes sustratos. Monroy (1998).

Microorganismos	Sustrato
<i>Bacteroides succinogenes</i> <i>Ruminococcus albus</i> <i>Acetivibrio cellobioparum</i>	Celulosa
<i>Bacteroides ruminicola</i> <i>Butyrovibrio fibrisolvens</i>	Hemicelulosa
<i>Lactobacillus ssp.</i> <i>Pseudomonas ssp.</i> <i>Clostridium butyricum</i>	Almidón
<i>Bacillus ssp.</i> <i>Clostridium ssp.</i>	Proteínas
<i>Anaerovibrio lipolytica</i> <i>Butyrovibrio fibrisolvens</i>	Lípidos

Los principales productos de la fermentación/hidrólisis de la celulosa por las celulasas bacterianas (Tabla 2.1) va a ser celobiosa y glucosa (Palatsi, 2010b), mientras que la hemicelulosa será degradada a pentosas, hexosas y ácidos urónicos (Campos, 2001). Por su parte las proteínas son fermentadas de forma secuencial a péptidos y aminoácidos. El origen de las proteasas que interviene en el proceso es diverso, proteasas extracelulares o péptidasas intracelulares, que hidrolizarán secuencialmente los aminoácidos a partir del extremo de las cadenas peptídicas (Campos, 2001). Finalmente el enlace peptídico es hidrolizado generando amoníaco y cadenas carbonadas (AGV ramificados de diferente naturaleza), también se generarán pequeñas cantidades de CO₂, H₂ y sulfuro reducido (Campos, 2001).

La degradación de lípidos en ambientes anaerobios consiste en una ruptura inicial de los triglicéridos y ello lo realizan un grupo de enzimas hidrolíticas (lipasas), los triglicéridos son hidrolizados a los correspondientes mono y digliceridos, ácidos grasos de cadena larga y glicerol (Campos, 2001).

2.1.1.1.2. Síntesis de CH₄: Fase (II) Acidogénesis.

Los azúcares (i.e. hexosas y pentosas), aminoácidos, AG de cadena larga y glicerol generados durante la fase de hidrólisis son fermentados a AGV, alcoholes, NH₄, H₂ y CO₂ (Ahring, 2003; Massé *et al.*, 2011). Algunos productos (i.e. acético, fórmico, H₂) pueden ser utilizados directamente por las bacterias metanogénicas, mientras que aquellos productos de fermentación más reducidos (i.e. láctico, etanol, propiónico, butírico) son utilizados como sustratos por las bacterias acetogénicas y oxidados a productos que pueden ser ya utilizados por las bacterias metanogénicas (Braun, 2007; Campos, 2001). En este sentido, bacterias del género *Propionibacterium* fermentan ácido láctico, carbohidratos y otros polihidroalcoholes generando propionato, succinato, acético y CO₂ (fermentación aceto-propiónica, Campos, 2001). La población acidogénica puede representar una fracción importante del total de población bacteriana presente tanto en los compartimentos de fermentación, como en las deyecciones pero tiene especial relevancia en digestores anaerobios donde puede representar el 90% de la población (Palatsi, 2010a). La capacidad reductora del medio [concentración de H₂] juega un papel importante en el crecimiento de estas poblaciones (Santianes *et al.*, 2009).

2.1.1.1.3. Síntesis de CH₄: Fase (III) Acetogénesis.

Tal como se ha citado anteriormente, esta fase marcará las diferencias entre la síntesis de CH₄ entérico y los procesos no-entericos o exógenos. En el primer caso, la mayor parte de AGV y otros sustratos (i.e. NH₃) serán absorbidos a nivel del retículo-rumen (fermentadores pre-gástricos) o en el tracto ceco-colónico (suidos, équidos y lagomorfos) o simplemente abandonarán el compartimento de fermentación sometidos a la cinética de flujo digestivo. En cualquier caso van a estar disponibles para su posterior metanización. Este no es el caso de los procesos de fermentación anaerobia que se produce en el medio ambiente y que incluye los procesos de metanización durante el almacenaje de las heces: en la fosa de purín o en los estercoleros. Estos procesos pueden producirse de forma natural o pueden ser optimizados en los procesos de digestión en los digestores anaerobios. En estos últimos casos (síntesis de CH₄ exógena) algunos productos de la fermentación pueden ser metabolizados directamente por las arqueas (H₂ y acetato), mientras que otros (valerato, butirato, propionato y algunos alcoholes o aminoácidos) deben ser previamente transformados a productos más simples como acetato, CO₂ e H₂ y esta transformación va a ser realizada por las poblaciones denominadas "acetogénicas" (Tabla 2.2). Este grupo de bacterias actúan sinérgicamente con arqueas metanogénicas (Massé *et al.*, 2011) para mantener o reducir la capacidad reductora del medio (concentración de H₂). Cuando la actividad reductora alcanza niveles excesivos se reduce la formación de acetato y CH₄ en aras de la formación de propionato, butirato y etanol (Campos, 2001). Por tanto

limitar las concentraciones de H₂ puede favorecer la metanización de los AGV (Ahring, 2003). Poblaciones acetogénicas son también las poblaciones de *Syntrophomonas wolfei* o *Syntrophobacter wolinii* (Boone y Bryant, 1980) que transforman el H₂ y CO₂ a ácido acético (Massé *et al.*, 2011) y se denominan homoacetogénicas y se consideran también dentro del grupo de especies que participan en esta fase acetogénica.

Tabla 2.2. Grupos bacterianos que participaran en la fase acetogénica.

Bacterias	Sustrato
<i>Syntrophomonas wolfei</i>	Butirato
<i>Syntrophomonas sapovorans</i>	Oleato
<i>Syntrophomonas wolinii</i>	Propionato
<i>Syntrophomonas buswellii</i>	Benzoato
<i>Syntrophomonas sapovorans</i>	AGV
<i>Syntrophus aciditrophicus</i>	Benzoato y AGV

Braun (2007); Massé *et al.* (2011); Monroy (1998).

2.1.1.1.4. Síntesis de CH₄: Fase (IV) Metanogénesis.

La metanogénesis va a dar lugar a CH₄ y CO₂ como principales productos gaseosos (Ahring, 2003; Braun, 2007) y las poblaciones que intervienen en este proceso se consideran como las más relevantes de las que participan en el consorcio (Braun, 2007), aunque su crecimiento es de los más lentos (Cherukuri, 2012).

Dentro del dominio *Archaea* (Figura 2.2) se distinguen siete grupos principales que comprenden un total de 17 géneros, morfológicamente, pueden ser bacilos cortos y largos, cocos de diferentes ordenaciones celulares, células en forma de placas y filamentosos y unos pueden responder a la tinción Gram de forma positiva y otros negativa (Carrillo, 2003).

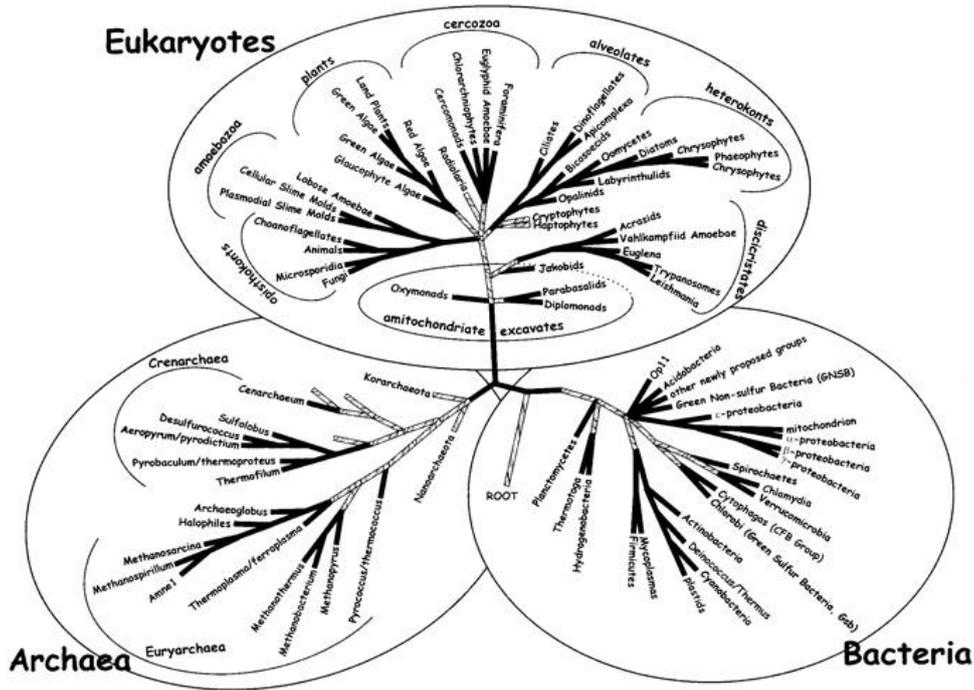


Figura 2.2. Dominio de las arqueas (Baldauf et al., 2004).

En cualquier caso se establecen tres grandes grupos bacterianos (Tabla 2.3) en función del tipo de sustrato utilizado (Worm et al., 2010), i) el grupo de *hidrogenotróficos* utilizadores de fórmico (Monroy, 1998) e hidrógeno (Massé et al., 2011), representadas por los géneros *Methanobrevibacter* y *Methanobacterium*; ii) el grupo de los *metilotróficos* que transforman los grupos metilos del acetato, metanol y algunas aminas (Cairó y París, 1988; Monroy, 1998) y iii) el grupo de metanógenas *acetoclásticas* que utilizan como sustrato el acetato, que es representada sólo por dos géneros identificados [*Methanosarcina* sp. (otros sustratos: metanol, metil-aminas y H₂/CO₂) y *Methanosaeta* sp. (exclusivo para acetato), Worm et al., 2010] que transforma el sustrato a CH₄ y CO₂ (Massé et al., 2011; Worm et al., 2010). Este grupo, arqueas acetoclásticas, es típico sólo en sistemas con moderada temperatura (33-50°C: Monroy, 1998) y bajo en contenido de sales (Worm et al., 2010).

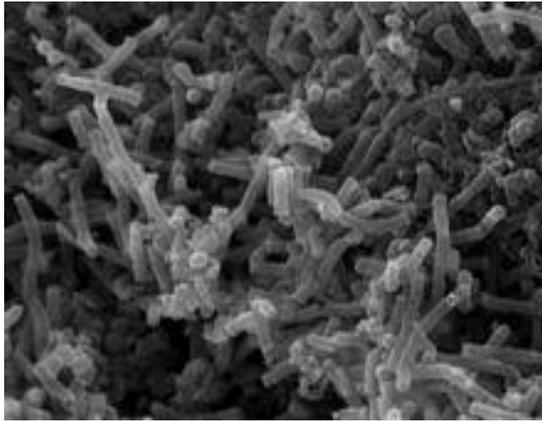
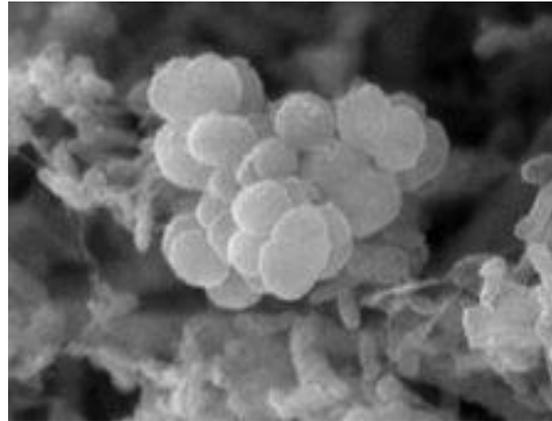
*Methanosaeta**Methanosarcina*

Figura 2.3. Morfología de las arqueas metanogénicas acetoclásticas, *Methanosarcina* ssp. y *Methanosaeta* ssp.

Tabla 2.3. Clasificación de las arqueas metanogénicas (Monroy, 1998; Saengkerdsub *et al.*, 2014).

Arqueas	Sustrato	pH	T (°C)
Metanógenas acetoclásticas:	Acetato	6-7	
<i>Methanosarcina barkeri</i> (227)			35-37
<i>Methanosarcina barkeri</i> (TM-1)			50
<i>Methanosarcina barkeri</i> (MS)			35-37
<i>Methanosarcina mazei</i>			35-37
<i>Methanosarcina</i> AZ		6,0-8,5	33
<i>Methanosaeta soehngeni</i>		6,8-8,2	
<i>Methanosaeta concilli</i>			
Metanogénicas hidrogenotróficas:	CO ₂ /H ₂	7	
<i>Methanobacterium thermoaceticum</i>			65
<i>Methanobrevibacter arboriphilus</i> AZ			33
<i>Methanabrevibacter smithii</i>			37
<i>Methanospirillum hungatei</i>			41
<i>Methanogenium bourgense</i>			37
Metanogénicas metilotróficas			
<i>Methanosarcina</i>	Metanol		
<i>Methanosfaera</i>	Metanol / H ₂		
<i>Methanomicrococcus blatticola</i>	Metanol / H ₂		
<i>Methanomicrococcus blatticola</i>	Metil-amina / H ₂		
<i>Methanosarcina</i>	Metil-amina		
<i>Methermicoccaceae</i>	Dimetilsulfide		
<i>Methanosphaera stadtmanae</i>	Metanol / H ₂		
<i>Methanomassiliicoccus luminyensis</i>	Metanol / H ₂		

La distribución de ambos grupos de arqueas variará en función del tipo de ecosistema, el primer grupo las arqueas metanogénicas hidrogenotróficas son mayoritarias en compartimentos de fermentación digestivos como lo es el retículo rumen (Janssen, 2010; Morgavi *et al.*, 2010). Mientras

que el segundo grupo será mayoritario y generará cerca del 73% de CH₄ a partir del acetato en los digestores anaerobios (Monroy, 1998). El crecimiento de estos microorganismos, las arqueas metanógenas, aisladas de vacas y ovejas son inhibidas por las sales biliares, en tanto, las metanogénicas aisladas de los no rumiantes toleran un rango mayor de dichas sales (Saengkerdsut et al., 2014).

La metanogénesis es catalizada por un conjunto único de enzimas. La metil coenzima M reductasa (MCR) es la enzima que cataliza el último paso reductivo de ambos tipos de metanogénesis, la reducción de CH₃-CoM a CH₄, es específica para las metanógenas y arqueas anaeróbicas (Hallam et al., 2003). No obstante según Madigan et al. (2003) pueden ser diversas las enzimas que participan en este proceso, divididas en dos grupos, i) las transportadoras de carbono y ii) en las que facilitan electrones en las reacciones de óxido reducción. La coenzima metanofurano "MF" activa el proceso de metanogénesis (reduce el CO₂ a formilo), transfiriéndola posteriormente al coenzima metanopterina "MP" (que actúa como portador de C en una etapa intermedia: genera una molécula de agua reduciendo el formilo a metileno y posteriormente a metilo), para finalizar con la conversión del metilo (CH₃) a CH₄ mediante el coenzima M "CoM" (portadora de C). Participando además en dicho proceso las coenzimas F₄₃₀, Coenzima B "CoB" y Coenzima F₄₂₀.

2.1.1.2. Emisión de CH₄ en ganado porcino.

En un meta-estudio realizado por Monteny et al. (2001) se sitúa la emisión de cerdos en niveles entorno a los 3,3 kg de CH₄ cerdo/año, aunque en la literatura existente podemos encontrar mayores tasas de emisión y más variables (3,9-21 kg CH₄ cerdo/año; Groot Koerkamp y Uenk, 1997. ver Tabla 2.4), de la emisión total, la producción entérica alcanzaría niveles del 50% (1,5 kg CH₄ animal/año, Van Amstel et al., 1993).

Los valores de emisión en porcino son siempre inferiores a los registrados en los fermentadores pre-gástricos (i.e. 95-119 kg CH₄ animal/año en vacuno adulto, Moss et al., 2000) y se caracterizarían por una elevada variabilidad explicada fundamentalmente por variaciones en los niveles de emisión registrado en las deyecciones. Datos de emisión correspondientes a Dinamarca (Mikkelsen et al., 2011) indican que el ganado vacuno contribuye a la emisión entérica de CH₄ en un porcentaje (86%) muy superior a la contribución entérica del porcino (9%), sin embargo, en la emisión procedente de las deyecciones (30% de la emisión total) la contribución del porcino es relevante (45,1), no obstante, inferior al vacuno (49,8%).

Tabla 2.4. Emisiones de CH₄, NH₃ y N₂O en ganado porcino (European Commission, 2003) en función de la fase productiva y tipo de alojamiento (Mínimos y máximos expresados en kg an/año).

Fase productiva	NH ₃	CH ₄	N ₂ O
Cerdas gestantes	0,40 – 4,2	21,1	-
Cerdas lactantes	0,80 – 9,0	-	-
Cerdos transición (< 30 kg)	0,06 – 0,8	3,9	-
Cerdos de engorde (> 30 kg)			
Alojamiento			
Emparrillado total	1,35 – 3,0	2,8 – 4,5	0,02 – 0,15
Emparrillado parcial	0,90 – 2,4	4,2 – 11,1	0,59 – 3,44
Sin emparrillado y con cama	2,10 – 4,0	0,9 – 1,1	0,05 – 2,40

El tamaño del compartimento de fermentación explica, parcialmente, las diferencias entre los niveles de emisión registrados entre rumiantes y monogástricos, sin embargo, cuando los valores de emisión se expresan por unidad de materia orgánica fermentada en los distintos compartimentos, las tasas de emisión siguen siendo superiores en los fermentadores pre-gástricos (44 a 63 g CH₄/kgMO fermentada en rumen: Pedreira *et al.*, 2013), inclusive cuando se corrigen por el PV^{0,75} (455, 567 y 279 mg/kgPV^{0,75}/día en vaca, pequeño rumiante y cerdo, respectivamente: Zervas y Tsiplakou, 2012) o PV (301, 491 y 6,5-105 mg/kgPV/día para una vaca, oveja y un monogástrico, respectivamente: Saengkerdsub y Ricke, 2014).

En los sistemas de fermentación anaerobios va a existir un exceso de actividad reductora (H₂) que es eliminada mediante diferentes procesos, uno de ellos es la formación de CH₄, de hecho la síntesis de metano actúa como un sumidero biológico para dicha actividad. La relación entre la generación de actividad reductora y emisión de CH₄ ha sido descrita fehacientemente en bibliografía (Morgavi *et al.*, 2010; Moss, 2000).

En las diversas rutas metabólicas que suceden durante la fermentación anaerobia, algunas van a ser generadoras netas de H₂ (i.e. la producción de acético y butírico, así como el crecimiento microbiano utilizando aminoácidos como fuente de N), mientras que otras van a ser consumidoras de H₂ (i.e. producción de propiónico, otros AGV o utilicen la urea como fuente mayoritaria; Morgavi *et al.*, 2010; Moss *et al.*, 2002). Los sustratos potencialmente fermentables que alcanzan los compartimentos de fermentación post-gástricos (ciego o colon) son componentes fibrosos, componentes amiláceos o proteicos indigestibles (Saengkerdsub *et al.*, 2014; Van Soest, 1994) por ello, en dichos compartimento va a instaurarse un tipo de fermentación donde predomina la acetogénesis y con ella cabría esperar una mayor producción de actividad reductora (H₂) y por tanto de la emisión de metano. No obstante, las condiciones de fermentación que se producen en dicho compartimento (i.e. elevados ritmos de

tránsito, pH y presión osmótica, competencia por sustrato “con acetogénicas y sulfato reductoras”) pueden limitar el crecimiento de los organismos metanogénicos (Moss *et al.*, 2000; Nakamura, 2010; Sahakian *et al.*, 2010) y adquirir especial relevancia otros procesos metabólicos que también pueden actuar como sumideros alternativos de la actividad reductora generada (i.e. acetogénesis, bacterias reductoras de sulfato o de Fe^{3+} , etc.).

De hecho estas condiciones de fermentación marcan también una predominancia (en relación al rumen) de los procesos de síntesis de CH_4 derivado de las especies acetoclásticas, es decir variaciones en la producción de metano en colon pueden derivar de variaciones en los títulos o actividad de las bacterias acetoclásticas (Carter y Barr, 2013).

En este sentido Belenguer *et al.* (2011) demostraron la estrecha relación que existe entre las condiciones de fermentación y la producción de CH_4 en un fermentador colónico, el conejo, la emisión de CH_4 “*in vivo*” fue reducida y muy variable, mientras que el cultivo “*in vitro*”, alterando y homogeneizando las condiciones de fermentación del quilo (ritmo de tránsito, pH, osmolaridad, etc.) la producción de CH_4 incrementó de forma manifiesta y se redujo la variabilidad individual registrada.

Por otra parte, Jørgensen *et al.* (2011) estudiaron la relación entre actividad reductora residual [H_2] y la síntesis de metano en cerdos alimentados con diferentes cantidades de fibra, dichos autores registraron una producción significativa de actividad reductora (H_2) a lo largo del tracto digestivo, dicha actividad fue máxima a final del intestino delgado y estuvo inversamente relacionada con la generación de metano, cuya síntesis fue solo detectada en colon.

La síntesis de CH_4 se produce en el tracto ceco-colónico (Jørgensen *et al.*, 2011) y este compartimento tiene un desarrollo tardío, aunque dicho crecimiento está determinado por el tipo de dieta y concretamente por la ingestión de fibra digerible (crecimiento atribuido generalmente a la producción de AGV, particularmente butirato y propionato que son principales fuentes de energía para estos órganos y estimulan su crecimiento: Van Soest, 1994), por ello es cierto que existe una tendencia a incrementar la emisión de CH_4 con el peso-desarrollo del animal (Noblet y Goff 2001). No obstante, es también cierto que con el peso vivo incrementa la ingestión de MS y cuando ambos parámetros se correlacionan, el efecto del desarrollo sobre los niveles de emisión tiene escasa relevancia (Christensen y Thorbek, 1987; Noblet y Shi, 1993). Por tanto, la emisión registrada en cerdas en lactación es mayor que la registrada en cerdos al final del cebo, no obstante, cuando los niveles de emisión se expresan por unidad de MS ingerida o fibra, los valores de emisión son similares (Jørgensen, 2007).

En relación al efecto del tipo de alimento sobre la producción de CH₄, citar que las raciones se formulan en base a diferentes ingredientes, cereales (maíz, sorgo, cebada, trigo, avena, etc.), subproductos y concentrados proteicos (harinas de extracción, i.e. tortas de soja, colza, girasol, algodón, etc.). Tras su ingestión algunas fracciones de estos alimentos escapan a su digestión en el intestino delgado y alcanzan al intestino grueso [≈ 50% polisacáridos no amiláceos (PNA) y almidón] y por tanto son susceptibles de ser fermentadas por las bacterias simbióticas que lo colonizan (Bach Knudsen, 2010). En la mayor parte de los casos, los PNA representan la fracción principal de carbohidratos que alcanzan el intestino grueso. El grado de degradación de estas fracciones depende de la composición química, su solubilidad y grado de lignificación, las fracciones más solubles (beta-glucanos, arabinosilanos y pectinas) son fermentadas al final de íleo e inicio de intestino grueso, mientras que las más insolubles (celulosas y arabinosilanos) lo hacen más lentamente en la sección distal del colon (Bach Knudsen, 2010). La utilización de productos fibrosos mejora el bienestar de los animales (mejor tránsito intestinal, reduce los procesos de ulceración) (Jørgensen, 2007), sin embargo, el incremento del nivel de fibra está asociado con la reducción del contenido de energía metabolizable disponible (Jørgensen *et al.*, 1996), dado que la emisión de CH₄ representa pérdidas irreversibles de energía (Jørgensen, 2007). Con la madurez del sistema digestivo (edad /peso) incrementa el grado de digestión, la capacidad y habilidad de fermentar la fracción de la fibra dietética (Jørgensen *et al.*, 2011), asociado al mayor tamaño del tracto digestivo y la mayor actividad enzimática, no obstante, el grado de digestión de los nutrientes siempre estará ligada a su procedencia botánica y al procesado de los ingredientes (Martínez Puig, 2006). En este sentido los trabajos de Jørgensen *et al.* (2011) confirman la variabilidad que se registra en porcino en la capacidad de fermentar la fibra, pero también en la producción de CH₄, que puede ser baja en ciertos animales independientemente de la cantidad y tipo de fibra ingerida. En general, en porcino se estima que la producción media de CH₄ se sitúa entre el 1-2% de la energía digestible ingerida (ED) (Crutzen *et al.*, 1986), emisión que fluctúa dependiendo de la edad (y/o peso) de los animales, cantidad de alimento y tipo de fibra (Noblet y Shi, 1993); variando dichas pérdidas entre el 0,1 - 1,3% en cerdos en crecimiento, 0,4 - 3,3% en cerdas no lactantes y 0,5% en animales en lactación (Jørgensen, 2007).

2.1.2. Emisión de amoníaco (NH₃).

El amoníaco (NH₃) a temperatura ambiente es un gas incoloro de olor penetrante, su ion el amonio (NH₄⁺), es muy soluble y ambas formas se mantienen en el medio en un equilibrio dinámico, dicho equilibrio dependerá de diversos factores, entre otros resaltar: el pH (Hansen *et al.*, 2007) y la

temperatura (Saha *et al.*, 2010). La transformación a NH_3 ($\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NH}_3$) y su volatilización incrementará con la temperatura y el nivel de pH del medio (Calvet, 2007).

En los ecosistemas naturales y en aquellos intervenidos por el hombre (actividad antropogénica: agricultura, ganadería, industria, etc.) el N sufrirá diferentes procesos y transformaciones a través de diferentes ciclos biológicos que suceden de forma simultánea o consecutiva. Podemos encontrar el N bajo diversas formas; mayoritariamente como proteínas, aunque otras formas orgánicas e inorgánicas son también importantes. El N-amoniaco ($\text{NH}_4^+ \leftrightarrow \text{NH}_3$) es un eslabón crucial en este ciclo, deriva mayoritariamente de la degradación, pero a su vez participa directa o indirectamente en la síntesis de muchas de ellas.

La contribución antropogénica a la emisión de amoniaco se sitúa alrededor de las 47 millones de TM y de las cuales el sector agrícola es responsable de un 94% (Steinfeld *et al.*, 2006). A dicha emisión agrícola, la ganadería contribuye en un 64% (Steinfeld *et al.*, 2006) y dentro de las especies de abasto la emisión derivada de la producción porcina ascendía en año 1997 al 6% de la emisión global (3,22 MT: Bouwman *et al.*, 1997). En nuestro país dicha proporción se incrementa hasta el 17,4% en los datos correspondientes al 2012 (EEA, 2014). En la Figura 2.4 se presentan esquemáticamente los flujos de N y N-amoniaco en aquellos ciclos en los que se involucra la actividad antropogénica y en dicha figura se puede apreciar la diversidad y complejidad de estos ciclos, en los cuales el NH_3 es rápida y eficazmente movilizado, ya sea en procesos hidrológicos o atmosféricos (Hofman y Van Cleemput, 2004).

Dentro del complejo proceso que constituye los flujos y el reciclaje continuo del N a través de los diferentes niveles tróficos, en la presente memoria nos centraremos en algunos aspectos específicos, como son la emisión de amoniaco derivada del proceso de producción ganadera y de la gestión de deyecciones haciendo especial hincapié en la ganadería porcina.

Consideramos que los flujos de N se desarrollan en tres fases fundamentales: la suelo, biomasa y aire (atmósfera); la dirección y relevancia de dichos flujos puede ser resumido según el esquema propuesto por Coma y Bonet, (2004).

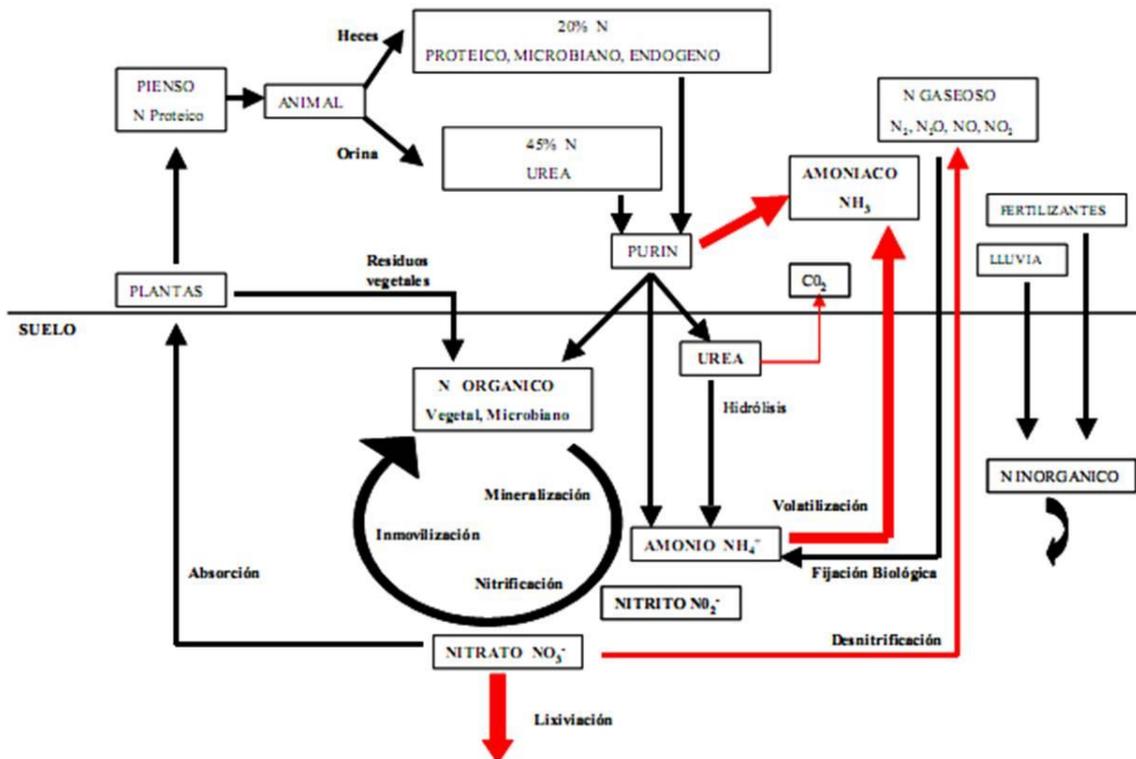


Figura 2.4. Ciclo del nitrógeno a través de las diferentes fases y niveles tróficos (Coma y Bonet, 2004).

En el suelo podemos distinguir un ciclo continuo de N, en el cual el N orgánico va a ser sometido a diferentes procesos de transformación; entre los que destacamos la mineralización, mediante la cual el N orgánico es transformado a formas no orgánicas (i.e. NH₄⁺), nitrificado (NO₃⁻) y captado nuevamente por bacterias para ser inmovilizado nuevamente en compuestos orgánicos en un ciclo continuo cuya intensidad variará con el tipo de suelo, su carga orgánica u otros factores más variables como son temperatura y la humedad (Hofman y Van Cleemput, 2004).

El N abandonará esta fase (suelo) a partir de su volatilización en forma de N amoniacal u otras formas gaseosas o tras su transformación a otros compuestos nitrogenados como son el N₂, N₂O, NO y NO₂ podrán abandonar dicha fase, mayoritariamente en forma de nitratos (NO₃⁻) por lixiviación. Estos compuestos nitrogenados serán vehiculados a través de los acuíferos (Coma y Bonet, 2004; Figura 2.4).

La incorporación del N en la biomasa se producirá a partir de la absorción de formas inorgánicas (NO₃⁻) y ellos ocurre en la zona reticular de las plantas donde se sitúan, en simbiosis, poblaciones bacterianas capaces de fijar N inorgánico en forma de sustancias orgánicas susceptibles de ingresar en los diferentes ciclos tróficos de las plantas y del resto de la biosfera. Una vez finalizado su ciclo vital

el N en los restos de plantas y animales, junto al de sus deyecciones reingresara en el suelo, completando así su ciclo edafológico.

Una parte del N atmosférico puede reingresar en el suelo cuando es arrastrado por las precipitaciones (agua, nieve y niebla), este NH_3 puede reaccionar con ácidos (i.e. ácido sulfúrico), formando sulfatos (i.e. sulfato amónico) que finalmente son depositados en el suelo (Hofman y Van Cleemput, 2004). Finalmente, el abonado constituye una importante contribución antropogénica al N del suelo.

Dentro de este ciclo, es importante señalar que el intercambio entre la biomasa y la atmósfera se realiza mayoritariamente en forma de NH_3 , que posee un doble origen, i) la degradación microbiana del N orgánico de los restos de las plantas y animales incluyendo sus deyecciones y ii) la degradación enzimática de la urea urinaria y que constituirá la fracción más importante (Figura 2.5).

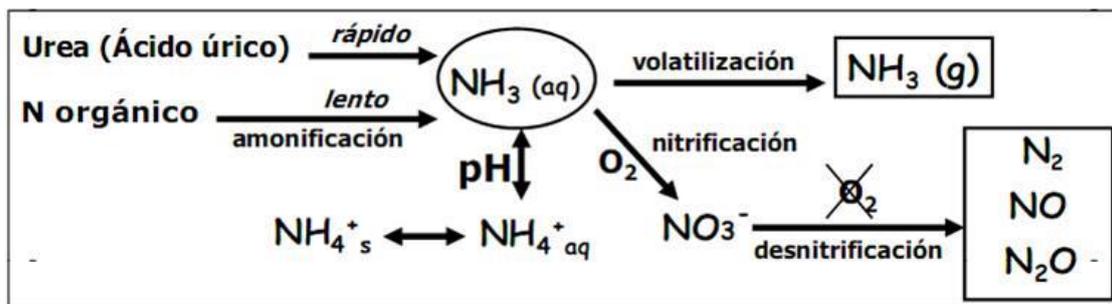


Figura 2.5. Ciclo del nitrógeno: reacciones a corto plazo (Calvet, 2007).

En el primer origen, la fermentación de la MO y específicamente las proteínas y los aminoácidos que la constituyen producirán N-amoniác, en dos formas (NH_4 y NH_3) que podemos encontrar en el medio en el siguiente equilibrio dinámico (Figura 2.6).

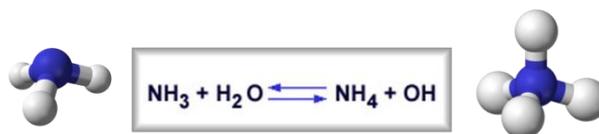


Figura 2.6. Equilibrio dinámico del nitrógeno en la fase acuosa (Calvet, 2007).

La primera forma, el NH_3 es un compuesto muy volátil y es emitido rápidamente a la atmósfera. En el segundo el ion amonio soluble, puede ser, en determinadas condiciones sometido a un proceso de Nitrificación que finalizaría con la liberación de N_2 gas. Este proceso está constituido por una serie de reacciones que se resumen en la siguiente figura:

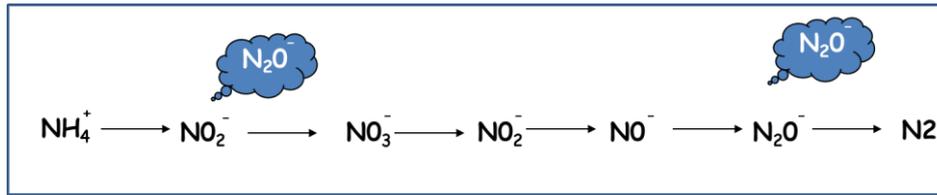


Figura 2.7. Esquema de la transformación y compuestos intermediarios que se producen durante el proceso de Nitrificación de amonio (Monteny *et al.*, 2001).

Cualquier alteración en este proceso, i.e. ausencia o exceso de ciertas poblaciones nitrificantes (i.e. *Nitrosomonas ssp*, *Nitrobacter ssp*), un exceso de sustrato (NH_4^+ , NO_2^-), así como una limitación en el O_2 disponible implicaran un proceso deficiente en la Nitrificación del amonio con el correspondiente incremento en la liberación de N_2O , cuyas consecuencia y características serán analizadas en capítulos posteriores.

En el segundo origen, donde el origen de NH_3 procede de la degradación enzimática de la urea (mamíferos) y ácido úrico (aves), las enzimas responsables de dicha fermentación son ureasas de origen microbiano; bacterianas en su mayor parte (90%), pero también fúngicas y protozoarias (Aarnink y Verstegen, 2007). Estos grupos enzimáticos son ubicuos y actuarán a pH neutros (pH óptimo 7,4), con una baja actividad debajo de los 5-10°C y sobre los 60°C, aunque son capaces de mantener elevados niveles de actividad a temperatura ambiente (Sommer *et al.*, 2006).

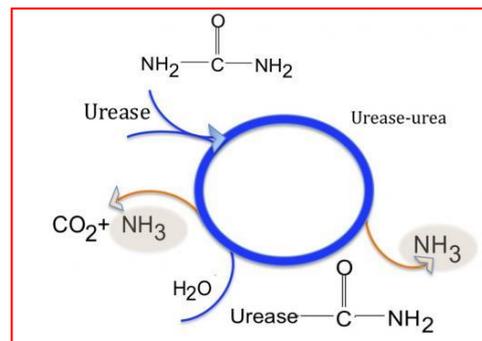
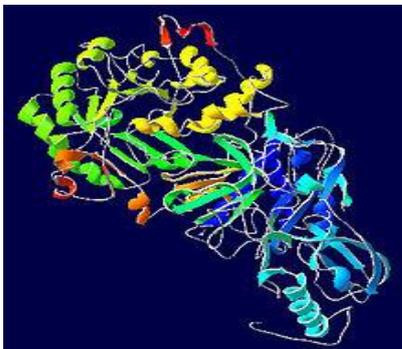


Figura 2.8. Estructura y actividad bioquímica de las ureasas bacterianas (Laprotax, 2014).

En estas condiciones, la degradación de la urea y la emisión de NH_3 a la atmósfera son procesos inmediatos y por ello este componente va a ser relevante cuando se trata de analizar el intercambio, en nuestro caso pérdidas irreversibles de compuestos nitrogenados desde la biomasa a la atmósfera. Considerando, el segundo origen, la emisión de NH_3 como pérdidas irreversibles dentro del ciclo del N, es importante conocer el lastre que dichas pérdidas implican sobre el ciclo trófico del N, considerando además que dicho impacto puede estar modificado por diversos factores, entre los más relevantes

destacar la especie animal; haciendo especial referencia a las diferencias existentes a nivel nutritivo entre las especies de abasto (i.e. rumiantes y monogástricos), sistema de explotación (intensivo vs extensivo), alimentación y la función fisiológica que consideremos.

En una especie monogástrica como el cerdo, en fase de crecimiento los animales fueron capaces de retener y transformar el 48% del N ingerido, el 50% apareció en las excretas mientras que la emisión de NH_3 se situó entorno al 7-9% del N ingerido en función del nivel de proteína de la ración (Dourmad *et al.*, 1999). El promedio de excreción para cerdas en gestación se situó entorno al 85%, la fracción en deyecciones fue del 40% y las pérdidas irreversibles en forma de NH_3 fueron del 20% del N consumido (Philippe *et al.*, 2011a).

Va a existir una relación negativa entre la eficiencia de incorporación de N y las pérdidas irreversibles de N, en forma de NH_3 ; en la especie porcina las mayores eficiencias se han obtenido en cerdas en lactación y en lechones cerca del destete (European Commission, 2003). Estos datos junto con las tasas registradas en otras especies de abasto se presentan esquematizados en la Tabla 2.5.

Con independencia de la eficacia con que las diferentes especies puedan utilizar el N de la ración, durante el proceso de almacenamiento y gestión de las deyecciones la emisión de NH_3 puede también variar, en función de una serie de factores entre ellos el tipo de manejo a que las deyecciones sean sometidas. En este sentido, Van der Peet-Schwering *et al.* (1999) sugieren que la emisión total de NH_3 se distribuye de la siguiente forma, un 50% correspondería a la emisión registrada en los alojamientos y durante el almacenamiento del purín (en fosa o balsa), mientras que una fracción similar (50%) se emitiría, de forma más lenta, durante la aplicación del purín al campo, y dicha fracción de NH_3 derivaría mayoritariamente del N proteico que paulatinamente sería sometida a procesos de degradación y mineralización (Aarnink y Verstegen, 2007). Sin duda el reparto en los niveles de emisión debe de estar determinado por factores tales como la climatología y el tipo de suelo, tal como se deduciría del trabajo de Botermans *et al.* (2010), quienes en climas más fríos (Suecia) y compartimentalizar la emisión en tres fracciones, obtuvieron que la emisión procedente de los alojamientos representó el 47% de la emisión total, durante el almacenaje del purín se emitió un 25% y la emisión registrada durante su aplicación a los cultivos representó sólo una fracción del 28% de la emisión total de NH_3 . Desafortunadamente, los autores de la presente memoria no han podido encontrar datos en nuestro país referentes a la discriminación de las emisiones de NH_3 entre compartimentos.

En cualquier caso, en lo que se refiere a ganado porcino, parece probable que los niveles de emisión más importantes se producirán durante el alojamiento de los animales, en lo que

correspondería a las superficies de contacto más aireadas (excretas – superficies del alojamiento) y en el purín almacenado en la fosa de deyecciones. En la tabla 2.6 se presentan esquematizados algunos resultados correspondientes a emisiones registradas en los alojamientos y que podrían ser representativos de la emisión en dicha localización.

Tabla 2.5. Eficacia en la utilización del N ingerido en las diferentes especies de abasto.

Especie	Estado fisiológico	(%) N retenido	Fuente
Porcino	Lechones (0-8 kgPV)	26,4	Dourmad <i>et al.</i> (1999)
	Lechones (7-12 kgPV)	59,5	ADAS (2007)
	Lechones (12-30 kgPV)	44,1	ADAS (2007)
	Lechones (8-28 kgPV)	40-50	Dourmad <i>et al.</i> (1999)
	Crecimiento (30-65 kgPV)	34,7	ADAS (2007)
	Acabado (65-100 kgPV)	29,2	ADAS (2007)
	Engorde hasta 108 kgPV	33-34,5	ADAS (2007); Dourmad <i>et al.</i> (1999); European Commission (2003)
	Crecimiento (40-80 kgPV), Italia	38,4	European Commission (2003)
	Engorde (81-120 kgPV), Italia	34	European Commission (2003)
	Acabado (121-160 kgPV), Italia	33,6	European Commission (2003)
	Cerdas (90-130 kgPV)	21,5	ADAS (2007)
	Cerdas adultas (235-240 kgPV)	10-16	Le Goff <i>et al.</i> (2002)
	Secas + gestantes	20,7	Dourmad <i>et al.</i> (1999)
	Cerdas lactantes (23 lechones/año)	22,9	ADAS (2007)
	Cerdas lactantes	20-41	Dourmad <i>et al.</i> (1999); Kornegay y Harper (1997)
		Cerdas gestantes	35-45
Bovinos	Vacas (producción leche)	23-40	ADAS (2007); Steinfeld <i>et al.</i> (2006)
	Vaca (producción de carne)	5	Steinfeld <i>et al.</i> (2006)
	Novilla: remplazo lechero (49-310 kgPV)	12,7	ADAS (2007)
	Novilla: remplazo lechero (310-580 kgPV)	5,3	ADAS (2007)
	Toros Holstein: cereal (90-480 kgPV)	14,2	ADAS (2007)
	Toros Holstein: silo maíz (90-490 kgPV)	8,6	ADAS (2007)
	Toros Holstein: silo hierva (90-500 kgPV)	9,3	ADAS (2007)
Caprino	Cabras (producción de 600 kg leche)	14,5	ADAS (2007)
Ovino	Corderos engorde (35-50 kgPV)	45,6	ADAS (2007)
	Corderos engorde (35-60 kgPV)	53	ADAS (2007)
Avícola	Gallinas en jaula (310 huevos/año)	28,4	ADAS (2007)
	Gallinas camperas (290 huevos/año)	32	ADAS (2007)
	Pollos de engorde	32-40	European Commission (2003); Calvet (2007)
	Patos de engorde	29,6	ADAS (2007)

Tabla 2.6. Niveles de emisión de NH₃ registradas en diferentes especies y tipos de alojamientos expresados en g NH₃ por plaza y año (Calvet, 2007).

Especie	Fase fisiológica	Emisión (g/plaza/año)	
		Estiércol	Purín
Porcino	Cebo	600 – 950	450 – 960
	Cerdas	360 – 1900	310 – 2.140
	Lechones	-	170 – 340
Bovinos	Lechero	600 – 1500	200 – 3.600
	No lechero	200 – 800	500 – 900
	Ternero	200 – 400	500 – 900
Gallinas ponedoras	En jaula	10 – 30	
	En suelo	50 – 130	
	Secado cintas	270	
Pollos	Sobre suelo	20 – 60	
Pavos	Sobre suelo	550	
Patos	Sobre suelo	40	
Conejos	Cebo en jaulas	150	
	Madres en jaulas	600	

Considerando las condiciones necesarias para que se produzca el NH₃, bien por la degradación enzimática de la urea (o ácido úrico) urinaria o por la degradación microbiana más lenta del N orgánico, aquellos parámetros que activen dichos procesos van a incrementar los niveles de amoníaco libre en el purín y por tanto su emisión (Saha *et al.*, 2010) y al contrario. Se ha demostrado que incrementos en los niveles de aireación, elevadas concentraciones de urea o tasas N/C en el medio y la densidad microbiana van a incrementar los niveles de emisión, mientras que aquellos que los ralenticen como pueden ser la anaerobiosis, acidificación del medio, bajas temperaturas o la minimización de las superficie de contacto van a reducirlas (Botermans *et al.*, 2010; MARM, 2010a; Van der Peet-Schwering *et al.*, 1999).

Finalmente señalar que la continuidad de la emisión de NH₃ en purín tras su aplicación al suelo, está determinada también por una serie de factores ambientales relacionados con la naturaleza del suelo (pH, textura superficial, características del perfil y aireación) y de las condiciones climáticas (niveles de precipitación y temperatura) (Botermans *et al.*, 2010). Algunas actividades humanas como la fertilización y el tipo de fertilizante nitrogenado, cantidad, tiempo y forma de aplicación afectaran a los niveles de emisión de NH₃ (Botermans *et al.*, 2010; Hofman y Van Cleemput, 2004; Steinfeld *et al.*, 2006). Otros factores colaterales pero dependientes también de la actividad humana, como la gestión de residuos de la cosecha, laboreo, compactación, drenaje, irrigación del suelo así como sus cambios de uso y la carga ganadera alterarán los niveles de emisión (Hofman y Van Cleemput, 2004).

2.1.3. Emisión de óxido nitroso (N_2O).

En contraste con la producción de CH_4 o NH_3 la emisión (N_2O) entérica y procedente de la gestión de las deyecciones tiene una menor relevancia. Su síntesis no es directa, el N_2O puede ser generado a partir de diversos compuestos o dicho de otra forma es un intermediario obligado en los procesos Nitrificación y Desnitrificación. El origen del N que constituye en N_2O procede, mayoritariamente, de la urea y el ácido úrico degradados previamente a amonio (NH_4^+) (Botermans *et al.*, 2010; Monteny *et al.*, 2001), no obstante, otras fuentes de N rápidamente degradables pueden participar en su origen (fertilizantes sintéticos, estiércoles [orina + heces]).

El N_2O posee un elevado índice de radiatividad (Solomon *et al.*, 2007), esto es 298 veces la del CO_2 y a su toxicidad contribuye al efecto destructivo de la capa de ozono (IPPC, 2006; Olivier *et al.*, 1998; Philippe *et al.*, 2007a; Smith *et al.*, 2010). Recientemente, su concentración en la atmósfera ha incrementado exponencialmente y actualmente supera en el aire las 320 ppb, con una tasa de incremento lineal de 0,7 ppb/año, lo que corresponde a una carga de N en la atmósfera de 1.534 Tg de N (Tg = 10^{12} g), y una larga vida (114 años) media en la atmósfera (Smith *et al.*, 2010).

En términos globales la producción de N_2O es de 17,7 TM, de ellas se emiten de forma natural 9,6; 8,1 TM se originan por la actividad antropogénica, contribuyendo en 6,2 TM la ganadería (Kroeze *et al.*, 1999). Es cierto que la producción de N_2O es muy inferior a la de metano, sin embargo, su superior actividad radiativa hace que en términos de equivalentes de CO_2 (Eq. CO_2) el impacto del N_2O pueda acercarse al 50% del impacto teórico descrito para el CH_4 (IPPC, 2006).

La emisión de N_2O se ha diferenciado convencionalmente según su origen, se considera emisión directa aquella originada a partir de sistemas de almacenamiento de estiércol/purín o la fertilización de cultivos y prados. El origen indirecto de dicha emisión derivaría de la desgasificación del N_2O disuelto en acuíferos y aguas superficiales, y que es procedente del nitrato lixiviado hacia aguas subterráneas (Bouwman *et al.*, 2010). El N_2O se produce por deficiencias en el proceso combinado y simultáneo de Nitrificación-Desnitrificación (N-y-D), por el cual el N-amoniacal se transforma a N_2 y que figura esquematizado en la Figura 2.9. Señalar que el N_2O es un intermediario obligado de dicho proceso y cuyo exceso implica, lógicamente, su emisión.

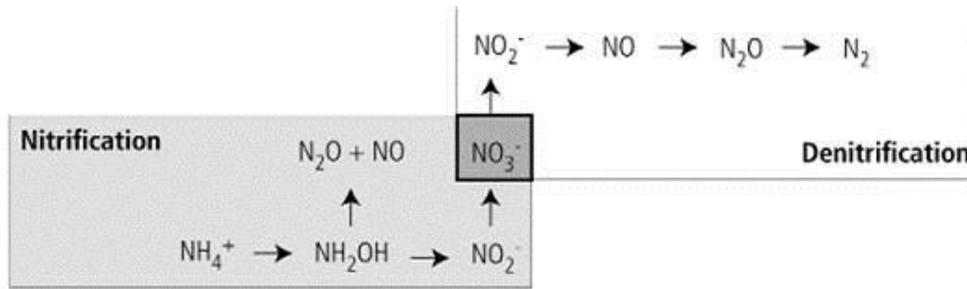


Figura 2.9. Proceso de Nitrificación y Desnitrificación (Hofman y Van Cleemput, 2004).

La N-y-D es un proceso heterótrofo que precisa y funciona a partir de diversos sustratos orgánicos y en cuya segunda fase – la Desnitrificación – puede realizarse a partir de dos vías, la desnitrificación biológica y la quimio-de-nitrificación. El proceso de de-nitrificación biológica se refiere a la reducción bioquímica de $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{N}_2$. En este proceso intervienen varios agentes biológicos de diferente naturaleza (i.e. bacterias, hongos). El proceso de quimio-de-nitrificación se refiere a un proceso similar, pero sin la intervención de agentes biológicos (Baggs y Philippot, 2010; Hofman y Van Cleemput, 2004).

En presencia de O_2 , el amonio es transformado por ciertas bacterias nitrificantes (i.e. *Nitrosomas* spp.; *Nitrobacter* spp.) a nitrato (NO_3^-) y posteriormente desnitrificado (en este caso en ausencia de oxígeno), hasta la liberación final de N_2 (Figura 2,7: Monteny *et al.*, 2001). Citar que en condiciones óptimas para el proceso (N-y-D), la producción de N_2O es mínima, pero la concentración de dicho intermediario incrementa y por tanto lo hace su emisión cuando coinciden ciertos factores que lo alteran o distorsionan.

En condiciones alcalinas, el NH_3 generado (y en exceso) inhibe el crecimiento de las bacterias nitrificantes (i.e. *Nitrobacter*: Hofman y Van Cleemput, 2004), el nitrito se acumula y se incrementa la producción de N_2O . Tasas bajas de C/N contribuyen a entorpecer el proceso de Nitrificación y participan en el incremento de la emisión de N_2O (Botermans *et al.*, 2010). Otros factores colaterales pueden incrementar también la emisión de N_2O , como son la concentración de oxígeno, la tasa nitrito/nitrato y la presencia de elevadas concentraciones de MO fácilmente oxidable (Botermans *et al.*, 2010; Firestone y Davidson, 1989, Monteny *et al.*, 2001). Por todo ello la producción de N_2O , es muy variable y ligada a una amplia diversidad de factores.

Citar la existencia de una vía alternativa de síntesis del N_2O mencionada, la transformación directa de NH_3 gas a N_2O , que se produciría a nivel de la estratosfera ($\text{NH}_3 + \text{O} \rightarrow \text{NH}_2 + \text{OH}$; $\text{NH}_3 + \text{OH} \rightarrow \text{NH}_2 + \text{H}_2\text{O}$; $\text{NH}_2 + \text{NO}_2 \rightarrow \text{N}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}$; $2\text{NH}_3 + 2\text{O}_2 \rightarrow \text{N}_2\text{O} + 3\text{H}_2\text{O}$; $\text{NH}_2 + \text{HO}_2 \rightarrow \text{NH}_3 + \text{O}_2$:

Dentener y Crutzen, 1994; Gang, 2002) ($\text{NH}_3 + \text{O}_2 \rightarrow \text{NO} + \text{H}_2\text{O}$; $\text{NH}_3 + \text{NO}_2 \rightarrow \text{N}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}$; Sharma *et al.*, 2011) por las especiales condiciones de esta zona. Los datos publicados al respecto son variables y en ningún caso podemos considerar que sea la contribución mayoritaria a la emisión de N_2O (10%; Dentener y Crutzen, 1994). No obstante y en el contexto de la presente memoria esta fracción adquiriría especial relevancia.

Las emisión de N a partir de los purines en forma de N_2O fue cuantificada por Kroeze (1998), y se situaron en torno al 0,1% del N total en purines líquidos mientras que alcanzaron el 2% (con un rango de variación entre 0,5 - 3%) en el estiércol sólido. Las bajas tasas de producción en los purines líquidos estaría relacionados con la elevada anaerobiosis y un escaso potencial de Nitrificación (Monteny *et al.*, 2001). En relación a la emisión de N_2O , existen escasos trabajos donde se analice el impacto de los parámetros productivos (i.e. manipulación de la ración, almacenaje de purín en la fosa) utilizados en la ganadería sobre la emisión de N_2O (Cardenas *et al.*, 2007), y los que existen se centran en lo que se considera el factor más relevante, la aplicación al suelo de estiércoles de ganado bovino sometidos a diferentes estrategias nutritivas (Arriaga *et al.*, 2010). Meta-análisis (European Commission, 2003) en los que se ha pretendido determinar los niveles de emisión, estos se han mostrado muy amplios (0,055 a 9,4 g N_2O /an/día) y variables en relación a las características de alojamiento (emparrillado total: 0,055 a 0,41; emparrillado parcial: 1,62 a 9,4 y sin emparrillar y/o con cama o yacija: 0,14 a 6,57 g an/día).

En el siguiente apartado se analizarán el impacto del manejo y factores ambientales (i.e. alojamiento) sobre la emisión de N_2O , pero también para la emisión del resto de gases objeto del presente estudio.

2.2. Emisión de amoníaco y gases con efecto invernadero (GEI) en ganado porcino: factores modificantes.

La capacidad de control sobre los procesos que dan origen a los GEI es limitada, son moléculas que participan y se originan en el propio metabolismo del animal [European Commission (2003)] ó durante la fermentación de los purines o en procesos microbiológicos más complejos que ocurren tras la aplicación de las deyecciones al suelo (N_2O). Por tanto, las posibilidades de intervenir en su proceso de producción y en su emisión son limitadas. En el caso del NH_3 y atendiendo a su génesis (Apartado 2.1.2) existe una mayor capacidad de control sobre sus niveles de emisión, a nivel de manejo e instalaciones, a lo largo de la cadena de producción (MARM, 2010a).

Los factores que pueden alterar los niveles de emisión se resumen a continuación (European Commission, 2003):

- a. Tipo y estrategias en alimentación,
- b. Diseño de las instalaciones de estabulación y sistema de recolección del purín,
- c. Ventilación de los alojamientos, frecuencia e intensidad,
- d. Temperatura ambiental, calefacción,
- e. Tipo y gestión de los purines,
- f. Aplicación de los purines.

2.2.1. Tipo y estrategias en alimentación.

La composición del alimento y la gestión de la alimentación son aspectos cruciales para mejorar el rendimiento productivo, pero a su vez repercuten sobre la producción cuantitativa y cualitativa de las deyecciones y el purín, y por tanto, sobre las emisiones a la atmósfera, suelo y agua (European Commission, 2003).

2.2.1.1. Proteína: Composición cualitativa y cuantitativa.

Manejar alternativas que permitan optimizar necesidades y aportes de PB / AA de acuerdo al estado fisiológico y al potencial de crecimiento animal permite, no eliminar, pero si minimizar la excreción de metabolitos y la emisión de gases tóxicos y/o nocivos (Henry y Dourmad, 1993; Rotz, 2004). Ello puede ser así combinando fuentes de proteína y AA sintéticos que permitan mejorar el perfil de aminoácidos esenciales y el valor biológico de la proteína (Dourmad y Sève, 1997), incrementando la digestibilidad de los nutrientes mediante la implementación de las raciones con aditivos adecuados (i.e. ácidos orgánicos, enzimas microbianas: fitasas, carbohidrasas y proteasas; Ferket *et al.*, 2002) o reduciendo ciertos compuestos que puedan incrementar las pérdidas endógenas de compuestos nitrogenados (Aarnink y Verstegen, 2007).

Por otra parte, el estudio de la relación entre los diferentes componentes dietéticos y la emisión de GEI y NH₃ debe ser considerado de forma global, dado que a nivel metabólico van a existir importantes relaciones entre los metabolitos responsables de las emisiones de los diferentes gases (European Commission, 2003), así la reducción de los niveles de PB de la ración mediante la suplementación con AA esenciales permite mantener el ritmo de crecimiento de los animales, pero se reduce la concentración de urea urinaria (Clark *et al.*, 2005), la excreción de N y emisión de NH₃ (Canh *et al.*, 1998a). Si esta estrategia se combina además con la inclusión de carbohidratos fermentable

para desplazar el N urinario a heces, la reducción en la emisión de NH₃ podría alcanzar niveles del 70% (Aarnink y Verstegen, 2007) y también se reduciría de forma colateral la emisión de N₂O al reducir la concentración de NH₃ en las deyecciones (Botermans *et al.*, 2010). Aunque es necesario señalar que en estas condiciones se ha registrado un incremento significativo en la emisión de metano, tanto en cerdos en cebo como cerdas adultas y en lactación (Jarret *et al.*, 2012; Le Goff *et al.*, 2002; Medina *et al.*, 2013). Constancia del impacto positivo en la emisión de NH₃ inducido por la reducción en el nivel de PB de la ración la podemos encontrar en el trabajo de Le *et al.* (2009), quien al reducir el contenido de PB (del 15 al 12%) manteniendo el equilibrio de AA no modificó la emisión de GEI (CH₄, CO₂ y N₂O), pero redujo los niveles de pH (0,51 unidades) de las deyecciones, la concentración de N y N-NH₃ (23,6 y 27,4%, respectivamente) y consecuentemente la emisión de NH₃ (28,6%). Niveles similares (61% de reducción en la emisión de NH₃) fueron registrados por Montalvo *et al.* (2013), al aplicar reducciones en el contenido de PB en dietas de lechones, del 19,7 al 16,6%.

2.2.1.2. Hidratos de carbono estructurales o no amiláceos: Utilización de fibra.

Las dietas utilizadas en porcino van a estar formuladas en base a cereales, como fuente principal de energía (i.e. maíz, trigo, cebada, etc.), pero también se utilizarán otros ingredientes, subproductos de cereales (fracciones de molienda, residuos de la industria de biocombustibles y alcoholes), sustitutos de cereales (i.e. yuca), legumbres (guisantes, habas, altramuza, etc.) y concentrados proteicos (harinas o tortas de soja, colza, girasol y algodón) (Jørgensen *et al.*, 2011).

Con la creciente demanda de alimentos para el consumo humano (i.e. cereales, legumbres, concentrados proteicos, etc.) se ha incrementado su precio y por tanto se ha limitado su uso para la formulación de alimentos para el ganado. Este hecho ha implicado además un incremento en la disponibilidad de subproductos de un elevado valor nutritivo, más ricos en fibra (Serena *et al.*, 2007). Por ello una de las estrategias que ha permitido mantener o reducir el precio de las raciones ha sido la sustitución del cereal por otras fuentes de alimentos como los subproductos de origen diverso, cuya inclusión va a implicar cambios en la composición bromatológica del alimento, entre esos cambios uno de los más relevantes es el incremento en el contenido de hidratos de carbono estructurales o fibra.

El incremento en el aporte de fibra en general, y fibra fermentable en particular, va a implicar muchas ventajas a nivel digestivo; incrementa la fermentación colónica, mejora el desarrollo y la maduración de la mucosa y disminuye la patogeneidad digestiva de muchas especies (Martínez *et al.*, 2004; Jørgensen *et al.*, 2011). No obstante, la inclusión de fibra posee algunos inconvenientes importantes, al incrementar el contenido de fibra se diluye la concentración energética de la ración y su

eficiencia de utilización (Jørgensen *et al.*, 2011) y con ello incrementa el índice de conversión (Lekule *et al.*, 1990). Por otra parte, los carbohidratos estructurales no son digeridos enzimáticamente y son fermentados en el colon, ello implica que son utilizados por las bacterias para producir AGV y CH₄ (Bedford, 1995). Por tanto la ingestión de fibra fermentable (FND: Van Soest, 1994) va a implicar un incremento en la producción de CH₄ con una pérdida irreversible de carbono, eficacia digestiva y un incremento en la emisión de CH₄. La incorporación de fibra poco fermentable no muestra un incremento relevante en la emisión entérica de GEI, pero si representa un sustrato potencialmente fermentable para su ulterior fermentación de componentes en el purín/estiércol, con el riesgo de producción de CH₄ durante el almacenamiento o su posterior aplicación al campo (Aarnink y Verstegen, 2007).

La presencia de fibra fermentable incrementa la actividad fermentativa a nivel de intestino grueso (Bedford, 1995) y ello implica un incremento en la síntesis/producción microbiana y una utilización del N-NP por parte de la flora. Con ello se reducirá la concentración de N-NH₃ en el tracto ceco-colónico e incrementara el gradiente de concentraciones con el plasma (Forsyrhe *et al.*, 1985: citado por Belenguer *et al.*, 2005). Estas modificaciones implican una recanalización de urea plasmática al colon y con ello, parte del N que sería excretado en la orina, rápidamente transformado a NH₃ y volatilizado es transportado al tracto ciego-colónico donde es incorporado a la proteína microbiana y proteína fecal (Hansen *et al.*, 2007; Jarret *et al.*, 2010). Excepto en el caso de los lagomorfos (i.e. donde existe un reciclaje de N a través de la cecotrofia), los animales monogástricos no podrán utilizar esta fuente de proteína que será excretada en las heces, no obstante, esta forma de N es más estable que la urea urinaria en relación a la emisión potencial de NH₃ (Canh *et al.*, 1997, 1998a; Clark *et al.*, 2005).

En este sentido, Bakker (1996) al sustituir el almidón de la dieta por diferentes tipos de fibra fermentable demostró una reducción en la excreción de N urinario y un incremento, del mismo orden, en la excreción de N fecal. Kreuzer y Machmüller (1993) cuantificaron dicha relación, al incrementar los niveles dietéticos de fibra (del 14 al 31%) la reducción del N urinario fue del 20 y el 28% del N ingerido. Estando dicha correlación relacionada con el tipo o la naturaleza de fibra (FND: Canh *et al.*, 1998b).

En trabajos realizados "*in vitro*" se demostró que al incrementar el nivel de hidratos de carbono no estructurales (fibra) se redujo el pH (0,12 unidades) e incrementó la producción de AGV fecales (0,43 y 0,51 g/kg fibra), disminuyendo así la emisión de NH₃ del purín (5,4 g/100 g fibra). Así por cada unidad porcentual de almidón de maíz sustituido por diferentes sustratos: torta de coco, cascarilla de soja y pulpa de remolacha seca, la emisión de NH₃ del purín se redujo un 0,35, 0,51 y 0,36%, respectivamente (Canh *et al.* 1998d). Montalvo *et al.* (2013) al utilizar como fuente de fibra pulpa de

remolacha, combinada con diferentes aportes de PB y la administración de un acidificante (ácido benzoico) confirmó los resultados publicados por Canh *et al.* (1998bc) en relación a las reducciones en la emisión de NH_3 , pero registró un aumento significativo en las pérdidas irreversibles C en forma de CH_4 . Dicho autor no pudo observar ningún efecto sobre la emisión de N_2O .

La emisión de CH_4 va a estar también correlacionada con la ingestión de fibra como se desprende de los resultados publicados por Jensen y Jørgensen (1994), quienes al alimentar cerdos al final del cebo con dos niveles de fibra (i.e. guisante y pectinas para alta fibra) obtuvieron una relación positiva entre los niveles de fibra y la emisión de CH_4 , que fue de 0,9 - 1,8 y 8,1 a 16,2 L/día en CH_4 , respectivamente, para los niveles bajo y alto de fibra.

2.2.1.3. Utilización de acidificantes o aceites en alimento y/o purín.

La utilización de ácidos orgánicos en el pienso incrementa la acidez de la digesta (quimo) y ello mejora la actividad proteolítica a nivel gástrico y la digestibilidad de la PB y AA (Hartog y Sijtsma, 2007), ello permitiría una mejora en la utilización de la proteína y consiguientemente una menor excreción de N en las heces. No obstante, si el incremento en la absorción de N se produjese por encima de las necesidades del animal, ello se traduciría en un incremento en la excreción urinaria del excedente de proteína en forma de urea y con ello en un incremento en la emisión de N. Es difícil suponer que la acidificación de la digesta pudiese tener un impacto directo sobre el pH urinario, dada la elevada capacidad metabólica del animal para tamponar estas variaciones. En cualquier caso en la literatura existente podemos encontrar resultados en los que se sugiere una hipotética correlación entre la administración de acidificantes, acidificación del pH urinario y una menor emisión de NH_3 (Canh *et al.*, 1998) al prevalecer en condiciones ácidas la forma iónica (NH_4^+), menos soluble, del N amoniacal (Aarnink *et al.*, 1998).

Una estrategia diferente consiste en la acidificación del purín mediante la utilización de ácidos orgánicos (i.e. ácido láctico), ello permite reducir los niveles de pH de la fosa ($\text{pH} \approx 4,5$) y con ello se favorece la prevalencia de la forma iónica (NH_4^+) y se reduce la emisión de NH_3 . La acidificación puede también reducir la emisión de CH_4 en la medida que el pH del purín pueda afectar, reduciendo la actividad del consorcio microbiano metanogénico (Berg y Hörnig, 1997).

Entre otras técnicas, el utilizar aceite de colza en la superficie del purín (de lechones alojados en piso emparrillado) ha mostrado excelentes resultados, reduciendo en 50% las emisiones de NH_3 y olores, sin embargo, la capa de aceite se desintegra y después de 25 días las emisiones de NH_3

incrementan. Por otra parte, las emisiones de metano aumentan en un 60% al aumentar la situación de anaerobiosis y degradarse el aceite (Pahl *et al.*, 2002).

2.2.1.4. Alimentación en fases.

Durante el cebo las necesidades cambian de forma continua con el crecimiento del animal; y mediante la alimentación en fases se pretende un mejor ajuste entre las necesidades y el aporte cualitativo y cuantitativo de nutrientes. Ajustando el aporte y balance de AA de la dieta (combinación de fuentes de proteína o sustituyendo la proteína por la inclusión de AA libres) permite cubrir las necesidades con una mayor precisión y con ello reducir el desperdicio de N en las deyecciones y la consiguiente emisión directa de NH₃ y -teóricamente- la emisión potencial de N₂O derivados de un exceso de amonio en el purín (Dourmad y Jondreville, 2007).

Ensayos experimentales en los que se compararon los niveles de excreción de N en las deyecciones (orina + heces) cuando cerdos en cebo (de los 25 a los 115 kg) eran alimentados en una fase única frente a una alimentación en dos y tres fases (Van Kempen y Van Heugten, 2001) describieron una reducción en la excreción de N que varió en 9 y 16%, respectivamente. Reequilibrando semanalmente los aportes, la reducción en el desperdicio de N alcanzó valores del 50% (Dourmad y Jondreville, 2007). Desafortunadamente los autores de la presente memoria no hemos podido encontrar datos que relacionen la alimentación en fases con la emisión gaseosa de CH₄ o N₂O.

2.2.1.5. Alimentación separada: Sexo.

Con la misma filosofía del apartado anterior es necesario desarrollar técnicas en alimentación que permitan minimizar la excreción de N, ajustando aportes y disponibilidad de AA en el pienso a las necesidades de los animales, además de ajustarlos a la etapa/potencial de crecimiento; se ha propuesto dicha técnica también para otros factores, entre ellos el sexo y el estado fisiológico (Hartog y Sijtsma, 2007). La alimentación por sexos pretende considerar las diferencias entre el sexo (i.e. machos, hembras y castrados) y sus interacciones con las diferentes funciones fisiológicas (i.e. crecimiento y mantenimiento). En general, los animales castrados muestran una mayor capacidad de ingestión y menor ganancia de tejido magro, mientras que las hembras muestran menores necesidades de proteína y AA que los machos (Ferket *et al.*, 2002; Hartog y Sijtsma, 2007). Considerar estas diferencias permitiría optimizar la utilización de proteína y minimizar el desperdicio/emisión de N.

2.2.2. Reducción en la emisión de GEI y NH₃: Alojamiento.

Ciertos factores relacionados con el tipo de alojamiento (i.e. temperatura interior y exterior, aireación, tipo de cama y material), así como otros relacionados con la gestión de las deyecciones (almacenamiento, tratamiento, aireación, pH, temperatura y área de superficie) van a tener una clara influencia sobre la formación, concentración y volatilización-emisión de gases en los alojamientos. Los factores más importantes se detallan y describen a continuación:

2.2.2.1. Tipo de suelo del alojamiento.

En los alojamientos más comunes la fosa de deyecciones está aislada del alojamiento mediante un suelo emparrillado que sustenta al animal y que permite el paso a las deyecciones, la zona de emparrillado varía desde un emparrillado total a diferentes fracciones del suelo del alojamiento. En suelo compacto o en yacija, animal y deyecciones comparten el mismo espacio físico y es común utilizar diferentes tipos de materiales como cama. En el sistema de engorde convencional se emplean generalmente suelos total o parcialmente emparrillados, mientras que en el caso de de cerdas gestantes o en lactación son más comunes los suelos compactos o yacija con diferentes tipos de cama.

El análisis del efecto del tipo de suelo sobre la emisión gaseosa nos muestra que cuando los animales están sobre suelos emparrillados los niveles de emisión de NH₃ son menores y dicha reducción en la emisión incrementa al hacerlo la superficie del emparrillado. Aarnink *et al.* (1996) demostró que los niveles de emisión de NH₃ se reducían hasta un 10% cuando, en las mismas condiciones experimentales, se comparaban las emisiones registradas con suelos emparrillados [25% de la superficie del alojamiento] frente a suelos compactos o en yacija. Y que dicha reducción alcanzaba niveles del 50% cuando el suelo del alojamiento era totalmente emparrillado.

En el mismo sentido Philippe *et al.* (2007a) comparó los niveles de emisión en cubículos con dos tipos de suelo; totalmente emparrillados y suelos compactos o en yacija a los que se añadía diariamente paja. Las raciones fueron idénticas y el estudio se realizó durante la totalidad del cebo (entre 20 y los 115 kg PV). Efectivamente, los niveles de emisión de NH₃ registrados en los suelos compactos (Yacija + paja) fueron superiores a los registrados con los suelos emparrillados (4,98 s.e. 0,85 vs 13,31 s.e. 3,45 g an/día), no se detectó ningún efecto sobre las emisiones de N₂O, pero las emisiones de CH₄ mostraron el signo contrario y el emparrillado incremento sus niveles de emisión (15,2 s.e. 2,58 vs 8,88 s.e. 1,23 g an/día). Citar que los valores de emisión (de NH₃ y CH₄), fueron en

el caso de los suelos compactos más elevados que los estándares de referencia citados por European Commission (European Commission, 2003).

El emparrillado permite la separación física del animal y que las deyecciones se acumulen en la fosa. Este sistema permite mantener más limpio al animal y al mismo tiempo reducir la superficie de contacto y con ello la aireación del purín (MARM, 2010a). Esta podría ser la causa de la reducción de NH_3 en la emisión del purín. No obstante, las ventajas relativas del emparrillado en relación a la emisión de NH_3 no son tan claras en relación a la emisión de CH_4 o N_2O . En el primer caso todos aquellos factores que incrementen la situaciones de anaerobiosis van a propiciar la emisión de CH_4 y ello ocurre cuando, se reduce la superficie de emparrillado y/o superficie de almacenamiento del purín, la hidratación del mismo o la utilización de películas (i.e. aceites) que favorezcan esta situación (Ahlgrim y Breford, 1998; MARM, 2010a; Pahl *et al.*, 2002). Dada la heterogeneidad de los factores modificantes de la emisión de N_2O es difícil predecir la dirección en que los factores citados alteran los niveles de emisión de N_2O .

2.2.2.2. Tipo y material de la cama.

El material utilizado como cama en los suelos compactos pero también aquellos parcialmente emparrillados pueden alterar los niveles de emisión gaseosas debido a diversas razones, (i) el animal ingiere parte de este material, (ii) modifica las condiciones físicas (i.e. superficie, volumen, humedad, etc.) y (iii) altera las características químicas purín (Blanes-Vidal *et al.*, 2008). El efecto del tipo de cama sobre los niveles de emisión fue analizado por Blanes-Vidal *et al.* (2008) quienes utilizaron dos tipos de materiales: paja de trigo y ensilado de maíz, ambos materiales incrementaron la emisión de NH_3 (32%) y redujeron de forma paralela la de CH_4 (44,26%), y ello fue así porque en ambos casos se incrementó la superficie de contacto e hipotéticamente la aireación de las deyecciones y con ello se incrementaron los ritmos de formación de NH_3 a partir de la urea y su volatilización. En el caso del CH_4 se incrementó la relación superficie-volumen, hubo una pérdida neta de anaerobiosis y por ello se redujo sus niveles de emisión (Blanes-Vidal *et al.*, 2008). El tratamiento experimental no alteró la concentración de N_2O . Por otra parte, las variaciones registradas entre sustratos no fueron homogéneas y en aquellos animales que se utilizó ensilado de maíz como material de cama emitieron más GEI (Eq. CO_2) que los que utilizaron paja (entre un 33 a 44%), sin embargo, a nivel de laboratorio la emisión de N_2O de la paja (68 mg/h/m^2) fue superior al emitido por el ensilado ($0,01 \text{ mg/h/m}^2$).

Al utilizar dos sustratos altamente lignificados (i.e. serrín y paja) el tipo de sustrato también alteró los niveles de emisión. Los animales que dispusieron de serrín como material de cama emitieron la

misma cantidad de NH₃ (12,16 vs 13,61 g an/día), pero redujeron la emisión de CH₄ (4,96 vs 7,39 g an/día). Los niveles de emisión de N₂O incrementaron con la utilización de paja (2,09 vs 0,03 g an/día). Citar que los niveles de emisión siguieron un ritmo circadiano y fueron inferiores en las fase nocturna que en la diurna durante los periodos de colección (Nicks *et al.*, 2003).

2.2.2.3. Diseño del alojamiento y del sistema de recogida del purín.

La gestión que se realice de las deyecciones asociadas al almacenamiento, tratamiento y recogida afectaran su estructura y composición, y por tanto influirán en los niveles de emisión, actuales (durante el almacenamiento) y posteriormente durante su aplicación al suelo (European Commission, 2003). En principio, las emisiones de NH₃ serán menores cuanto menor sea la superficie de la fosa interior y ello es así al reducir la superficie de intercambio y de aireación (MARM, 2010a). Este efecto es también notable sobre la emisión de CH₄, pero en este caso al reducir la zona de emparrillado, la colección y acumulación de excretas y la anaerobiosis incrementaría, y con ello la emisión de dicho gas; pero en las deyecciones depositadas y almacenadas en la zona compacta - más aireada - se debería dar el proceso contrario, con el cual el balance final sería incierto (Ahlgimm y Breford, 1998). El impacto que pueda tener el diseño sobre la emisión de N₂O es también incierto.

Además del diseño de los suelos (compacto vs emparrillado) otros parámetros o características del diseño podrán modificar los niveles de emisión en la medida que alteren factores [como las temperatura de la nave, la densidad animal o la disposición del mobiliario (i.e. bebederos)] que estimulen a utilizar las zonas compactas como zona sucias, estimulado así la emisión de gas (European Commission, 2003). Por otra parte la utilización de materiales no porosos en los emparrillados (plásticos, materiales metálicos y hormigones tratados) favorecer el drenaje de las deyecciones a la fosa y ellos se relacionaría con una menor emisión (MARM, 2010a).

La frecuencia de retirada de purín reducirá los niveles de emisión, básicamente de aquellos gases con una relación positiva con los niveles de anaerobiosis (i.e. CH₄) y es por ello que se tiende actualmente a realizar- en cebo- vaciados semanales (MARM, 2010a). En la siguiente tabla se aparecen resumidas diferentes características del diseño de los alojamientos porcinos sobre el balance de emisión de GEI y NH₃.

Tabla 2.7. Eficiencia medio ambiental de alojamiento propuestos por el MARM (2010a) respecto al sistema de referencia convencional.

Sistemas	Variación de las emisiones en %			
	NH ₃	N ₂ O	CH ₄	CO ₂
Gestación. SR: Emparrillado total y frecuencia mínima de vaciado				
Emparrillado parcial y fosa reducida	↓20 ^a -50	↓68	↓28	
Cama de paja bien manejada, sustitución semanal	↓14	↑178	↓66	↓27
Vaciado frecuente (semanal)	↓25 ^a	↓83	↓19	
Lactación. SR: Fosa profunda con sección rectangular				
Fosos independiente (agua y deyección)	↓52 ^a			
Rampa en la fosa de purines	↓32-65 ^a	↓43	↓65	↓43
Transición. SR: Emparrillado total, fosa profunda rectangular y vaciado a final del ciclo				
Fosa en pendiente para separar orina y heces	↓30 ^a -60	↓27	↓6	↓50
Suelo parcialmente emparrillado y fosa reducida	* 25-35 ^a			
Vaciado frecuente (semanal)	↓25	↓41	↓10	↓27
Cebo. SR: Emparrillado total fosa profunda sección rectangular y frecuencia mínima de vaciado				
Suelo parcialmente enrejillado	↓30-35		↓30-38	↓37-41
Fosas en forma de uve (V)	↓10-30		↓51-52	↓6-8
Cama de paja bien manejada, sustituir semanal	↓20-30 ^a			
Vaciado frecuente (semanal)	↓30-60		↓30-65	↓30-60

SR: sistema de referencia; ^a: European Commission (2003)

↓: Disminuye;

↑: Aumenta;

2.2.2.4. Sistema y caudal de ventilación: Regulación de la temperatura.

Mediante la ventilación se pretende regular la temperatura, humedad y reducir/limitar la concentración de gases en el alojamiento. Obviamente los gases son el producto de la actividad digestiva de animales y de sus deyecciones (Saha *et al.*, 2010) y es por ello que los niveles de ventilación son ajustados al confort y eficacia productiva del animal (MARM, 2010a). No obstante, la ventilación puede afectar a la emisión como se deduce de los trabajos de Granier *et al.* (1996), quienes durante el periodo del cebo demostraron que un incremento en los niveles de ventilación la concentración de NH₃ en alojamiento disminuía, pero se incrementa la emisión total de NH₃. Estudios recientes de Dubeňová *et al.*, (2014) muestran mayor emisión de N₂O para cerdos en cebo (25,4 kg PV) cuando el caudal de ventilación es menor, respecto a un caudal medio y alto (0,006, 0,013 y 0,022 m³/segundo/m², respectivamente). En sentido contrario, la reducción de la temperatura en los alojamientos y la reducción de flujo de aire sobre las deyecciones permiten reducir la emisión de NH₃. No obstante una aireación insuficiente y un incremento no deseado de temperatura (i.e., verano) reducen el confort y altera el comportamiento de los animales. Dichas alteraciones pueden traducirse en cambios en los niveles de emisión al cambiar los hábitos alimenticios y de excreción (MARM, 2010a). El incremento de temperatura ambiente va a calentar el purín y con ello se activará la actividad

microbiana con toda la batería de cambios que ello representa en relación a los niveles de emisión (Haeussermann *et al.*, 2006).

Estudios más recientes que combinan la ventilación de fosa y la ventilación del resto de la sala de engorde, han permitido disminuir la concentración de NH_3 en el aire evacuado de las salas en 46%, pero la emisión total de NH_3 se ha incrementado ligeramente (Saha *et al.*, 2010).

III. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL

III. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL.

El impacto ambiental de gases tóxicos como es el amoníaco (NH_3) o los gases con efecto invernadero (GEI: CH_4 y N_2O) cobra cada día mayor relevancia (UNFCCC, 2007), y aunque es cierto que la emisión entérica de GEI es muy superior en los animales rumiantes (Cabra-López *et al.*, 2008), la producción en las especies monogástricas no es despreciable (Belenguer *et al.*, 2004; Zervas y Tsiplakou, 2012), especialmente cuando, i) se consideran conjuntamente emisión entérica y procedente de las deyecciones, ii) si los datos se consideran atendiendo a la dimensión de nuestra cabaña (i.e. 5,7 Millones de bóvidos frente a 25,5 Millones de cerdos; MARM, 2013ab).

Por otra parte, en porcino, las estrategias propuestas para mitigar el impacto de la emisión de NH_3 , no consideran las interacciones con otras emisiones. El incremento en el aporte de fibra digestible recanaliza la excreción urinaria de urea hacia el intestino grueso y con ello se reduce las emisiones de NH_3 (Canh *et al.*, 1998cd), pero incrementa el aporte de NH_3 y C-soluble, y con ello la actividad de las bacterias metanogénicas con el consiguiente incremento en la emisión de CH_4 (Jørgensen, 2007) y N_2O (Cardenas *et al.*, 2007).

A partir de estas premisas, en el presente proyecto se pretende cuantificar de forma conjunta los niveles de emisión de amoníaco (NH_3), metano (CH_4) y óxido nitroso (N_2O) en explotaciones porcinas sujetas a sistemas intensivos y en condiciones comerciales de explotación, analizando el efecto de ciertos factores nutritivos (fibra y proteína), tanto sobre la emisión entérica como “a posteriori” durante el almacenamiento del purín en la fosa.

Este objetivo general se desdobló en los siguientes objetivos parciales:

1). Diseño y puesta a punto de los procedimientos que permitan cuantificar la emisión de NH_3 y GEI “in situ” y en condiciones comerciales de explotación. Ciertos gases se generan durante los procesos metabólicos (i.e. CH_4) y otros a partir del almacenamiento de las deyecciones (CH_4 , NH_3 , N_2O , etc.) a través de diferentes procesos: la fermentación, degradación enzimática (ureasa) o por alteraciones de diversa índole en algunos ciclos (i.e. presencia de ciertas especies microbiológicas, aireación, temperatura durante la formación de N_2 a partir de NH_4^+). Optimizar el protocolo de cuantificación y diferenciar emisión entérica y del purín, fue el punto de partida de los ensayos propuestos. Para la consecución del primer objetivo se planteó un ensayo inicial en el que se utilizaron 64 animales alimentados con raciones comerciales. Los niveles de emisión se cuantificaron en dos fases (60 y 97 kg PV) con niveles de llenado de la fosa de 7 a 10 días. El aire de los ME se renovó a

partir de una chimenea de extracción cuyo flujo fue controlado y el aire muestreado de forma continua. Muestras de la superficie del purín fueron aisladas mediante cámaras de flujo constante (CFC), cuyo gas era renovado y muestreado de forma también continuada. El muestreo diario de ambos elementos ME y CFC nos permitió establecer las variaciones circadianas de los niveles de emisión.

2). Optimizar el procedimiento de estimación de la emisión potencial del purín: emisión de CH₄.

Para determinar la producción potencial de gas en el purín se procedió a su “metanización” completa (a 56 días). Para ello, se propuso como objetivo establecer una metodología rápida y eficaz que nos permitiese establecer los niveles potenciales de emisión de metano del purín. Como factores promotores de este proceso de “metanización” se analizaron los siguientes factores: i) Dilución del purín, ii) Utilización de diferentes fuentes de carbohidratos estructurales y iii) Enriquecimiento del medio con poblaciones exógenas de arqueas metanogénicas procedentes de heces frescas de vacuno lechero. Para la puesta a punto de una metodología se partió del protocolo “*in vitro*” propuesto por Theodorou *et al.* (1994) y se basa en un ensayo discontinuo, utilizando pequeñas cantidades de sustrato en un medio donde podemos encontrar una biodegradación vía anaerobia de sustrato orgánico con una producción máxima de metano. El sistema propuesto nos permitió determinar y construir modelos de respuesta entre producción de gas y los diferentes periodos de incubación.

3). Estudio de los niveles de emisión de NH₃ y GEI en cerdos: Fase de Transición. Para alcanzar el objetivo propuesto se utilizaron cerdos en fase de transición (80 animales desde el destete hasta los 25 kg PV) alojados en dos ME con la metodología descrita y validada previamente; con dos excepciones: los suelos de los ME fueron totalmente emparrillados y las fosas no fueron vaciadas durante la totalidad del período de transición; por tanto la emisión del purín correspondió a periodos de almacenaje de 36-38 días. Los cambios en el protocolo experimental se realizaron para adaptar las condiciones experimentales a los sistemas de transición de lechones utilizados de forma convencional.

4). Evaluación del efecto del nivel de fibra y proteína de la ración sobre los parámetros productivos y la emisión gaseosa en cerdos en cebo. Para la consecución de este objetivo se diseñó un cuarto experimento en el que se pretendió analizar y cuantificar el efecto del nivel de fibra digestible (FND) y proteína (PB) de la ración sobre: parámetros productivos, digestibilidad, emisión gaseosa y cambios en la flora del quilo. Para ello se utilizaron 64 machos enteros (cruce, Landrace x Large-White) a partir de las 6 semanas de vida (13,5 kg PV). Los animales fueron alojados en cuatro ME, 16 animales por ME y dentro de cada ME/ 4 animales por corral. El periodo de cebo se dividió en tres fases de alimentación de 35 días por fase [Fase I (13 a 40 kg), Fase II (41 a 70 kg) y Fase III (71 a 100 kg)], de forma sucesiva en cada fase el contenido en PB de la ración control (CTR) se redujo (18,

15,5 y 13,2% para las Fases I, II y III, respectivamente). Adicionalmente la ración control suministrada en cada fase (CTR) se incrementó respectivamente en un 2, 3,5 y 5% de PB o FND. De forma que cada fase- un grupo de animales (16 animales, 4 corrales por ME) recibieron la ración CTR (BPNF), que fue incrementada con el correspondiente nivel de proteína bruta (APNF), de fibra neutro detergente (BPAF) o de ambas (APAF).

Las raciones fueron formuladas en base a cebada, utilizando la torta de soja como fuente de PB y la pulpa de remolacha como fuente de fibra (FND). En cada fase, semanalmente se registró el peso (individuo), los consumos (por corral) y al final se determinó el contenido de grasa corporal. Las determinaciones de digestibilidad aparente (MS, MO, EE, PB, FND y almidón) se realizaron también al final de cada fase y para ello, 8 animales/ración, recibieron Cr_2O_3 como marcador indigestible y tras cinco 5 días de adaptación se procedió al muestreo de contenido rectal (intervalos entre muestreos de 8 horas durante 48 horas). Finalizada la fase de cebo (F III), 48 cerdos se sacrificaron y se procedió a determinar las características de la canal.

La emisión entérica y la proveniente de las deyecciones se determinaron según el protocolo puesto a punto en el presente trabajo. La emisión potencial de gas de las heces y el purín fueron también evaluados a partir de muestras rectales y muestreo directo del purín en la fosa según las técnicas descritas y desarrolladas en la presente memoria.

Finalmente, se procedió a determinar las condiciones de fermentación ceco-colónicas y se analizó la concentración y evolución de las poblaciones metanogénicas a lo largo del tracto intestinal. El estudio se desarrolló inmediatamente tras el sacrificio (16 animales/4 por ración experimental), tras el cual el tracto intestinal fue diseccionado, aislado, ligado y muestreado. Tipos y concentraciones bacterianas se determinaron por qPCR haciendo especial hincapié en las poblaciones relacionadas con la producción de metano (arqueas hidrogenotróficas y acetoclásticas). El análisis químico y microbiológico se realizó también en el purín.

III. Objetivos y planteamiento experimental

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Desarrollo metodológico.

4.1.1. Procedimiento de estimación directa de la emisión de gases en instalaciones convencionales: Emisión entérica vs emisión procedente de las deyecciones.

4.1.1.1. Instalaciones.

Los experimentos se desarrollaron en las instalaciones del Centre d'Estudis Porcins de Catalunya (CEP). En dichas instalaciones la zona de cebo consta de cuatro módulos independientes que disponen de fosa y ventilación controlada, independiente para cada módulo (Ambitrol 100, modelo 103, Sistemes Electronics PROGRES S.A., Bellpuig, Lleida, España). Cada módulo está dividido, a su vez, en cuatro corrales (1,45 x 2,8 m) con una capacidad de 4 animales/corral (1,05 m²/cerdo). Los corrales están separados, dos a dos, por un pasillo central (1,23 m) y cada corral está dotado de una zona del emparrillado o "slat" de hormigón que ocupa una superficie de 2,11 m² (52% de la superficie total). [Figura 4.1, alzado de cada módulo y disposición del slat]. Cada corral a su vez está provisto de un comedero de tolva automática para alimentos secos (Durofarm, Aco Funki A/S, Herning, Dinamarca) y un bebedero (tipo Ebro, Genebre, Barcelona, España) dispuestos en la zona del módulo con suelo de cemento y emparrillado, respectivamente.

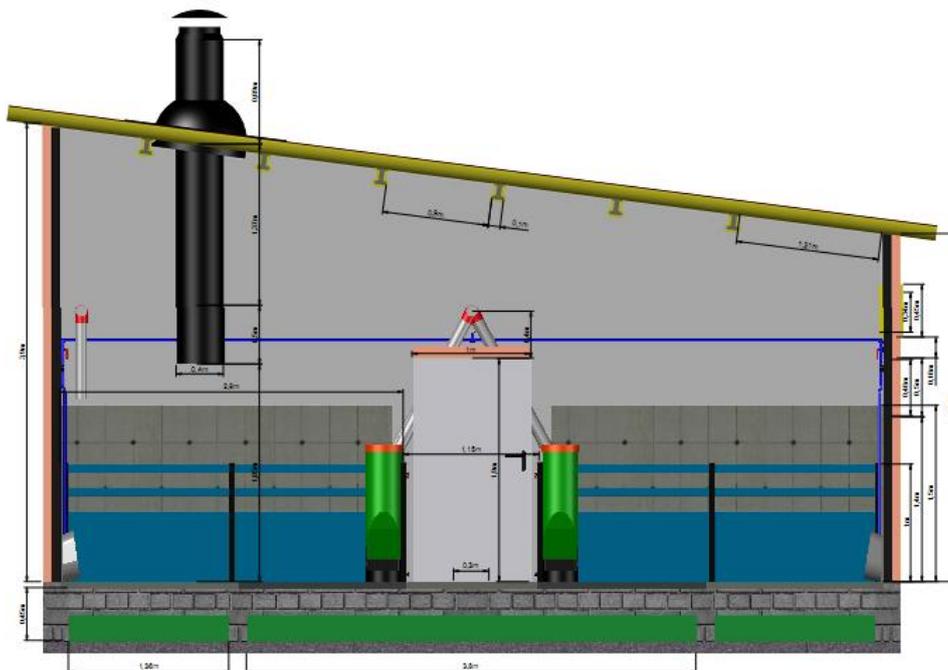


Figura 4.1. Vista lateral y alzados de un módulo de cebo o engorde.

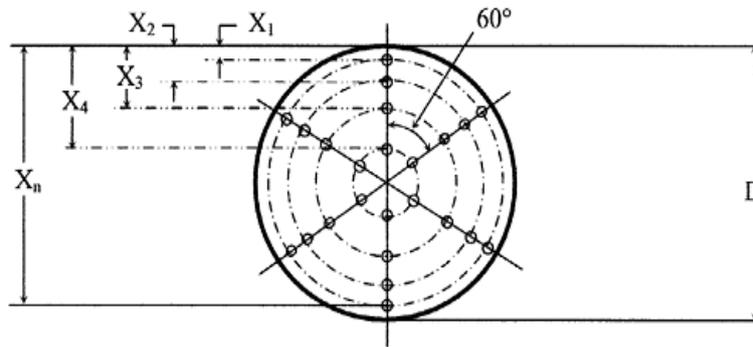
Los módulos estancos, disponen de una entrada de aire o punto de ventilación único a través de una ventana con marco de PVC y persiana dinámica (1 x 0,34 m) ubicada a 2,1 m del suelo. La chimenea de salida, construida con polietileno de alta densidad (40 cm Ø interior) está dotada con un extractor (SODECA, modelo HEP-40-4M/L, Sodeca, Barcelona, España) y se sitúa a una distancia de 5,5 m de la entrada de aire y su boca se sitúa a 1,85 m del suelo (Figura 4.1). Cada módulo, además, está dotado de un controlador de temperatura y de la humedad relativa del aire (Testo 174T y Testo 174H, Testo AG, Lenzkirch, Alemania), que registra dichos parámetros a intervalos de 10 min.

Bajo el emparrillado se sitúan 2 fosas de deyecciones (1 fosa c/2 corrales) construida en cemento y cuyas dimensiones (1,37 x 2,75 x 0,44 m) se corresponden, en general, con las utilizadas en las explotaciones comerciales. El drenaje, por gravedad (11% pendiente; 0,2 m Ø salida) conduce el purín a través de un canal (1,5 x 0,30 x 0,3 para L x A x A) a una arqueta central que comparte con la fosa adyacente del mismo módulo. La arqueta, cuyo registro se sitúa en el pasillo, drena directamente a la balsa.

4.1.1.2. Sistema de determinación de la emisión gaseosa en los módulos.

Dentro del sistema de cuantificación podemos distinguir dos componentes: a) Medida del flujo de renovación y b) Muestreo continuo de la entrada y salida de aire.

a) La renovación del aire de cada módulo se realizó a partir de los extractores situados en las chimeneas, el módulo de engorde fue tratado como un compartimento estanco asumiendo que el flujo de salida a través de la chimenea debe ser igual a la entrada y se asumió que la estructura del compartimento permitiría una mezcla homogénea de los gases presentes en el medio. El caudal de salida fue estimado mediante procedimiento sugerido por la AMCA (AMCA, 1990) y las mediciones puntuales (relativas) de la velocidad del aire se realizaron utilizando un anemómetro de hilo caliente (Testo 425, modelo 0560 4251, sonda telescópica de hilo caliente, electrodo N° 5412983, Lenzkirch, Alemania). Las velocidades de flujo se midieron en los puntos indicados por AMCA (1990) y cuyo esquema se presenta en la Figura 4.2. Los niveles de aireación se incrementaron con la fase de crecimiento y el cálculo de la emisión gaseosa absoluta fue corregido en función de la temperatura exterior e interior del módulo experimental.



X_i : Distancias diametrales (Ocfemia *et al.*, 2005),

Figura 4.2. Distribución de puntos en la diagonal para la medición de la velocidad.

b) Muestreo del aire. Tras 28 días de adaptación a la dieta y 7 días de llenado de la fosa se procedió al muestreo continuo del aire de salida (chimenea de extracción) y entrada (punto de entrada) se realizó mediante sendas sondas de muestreo (Teflón 4 mm \varnothing interior: PTFE, Campo Fluid, Barcelona, España) situadas en el punto medio de la diagonal [punto de entrada] y diámetro [chimeneas de extracción] conectadas ambas a una bomba peristáltica de 8 canales (Gilson, Minipuls 3 Peristaltic Pump, Gilson SAS, Villiers Le Bel, Francia) que permitía mantener un flujo [16,5 ml/min.; Digital FlowCheck-HRTM Part N.º. 5700, Alltech Associates, Inc. Deerfield, Estados Unidos] constante de muestreo de ambas fracciones gaseosas. Se situaron filtros de fibra de celulosa en el extremo de muestreo, a fin de evitar que las partículas de polvo contaminantes dañasen los equipos analíticos. El aire muestreado se almacenó en bolsas de plástico de 100 μ m de grosor (capa externa de Poliamida y capa interna de malla polietileno, Garhe, Amorebieta, España) en las que el gas fue muestreado mediante tubos *vacutainer* de 10 ml (Vacutainer™ REF 367615, Plymouth, Reino Unido) con los que era transportado al laboratorio para su análisis inmediato (Lopez y Newbold, 2007).

4.1.1.3. Sistema de medición de la emisión procedente de la fosa de deyecciones.

Para determinar la emisión de gases procedentes de la fosa de deyecciones se procedió a aislar una fracción de superficie del purín (283 cm² \varnothing) mediante campanas de flujo constante (CFC) diseñadas a tal fin. Las campanas se construyeron con tubos de Polietileno (283 cm² \varnothing y 43 cm de alto) para ser instaladas en la fosa bajo el emparrillado. La parte superior se cerró con tapones del mismo material mientras que la parte inferior, abierta, se apoyó en el suelo de la fosa. La zona en contacto (parte de la CFC sumergida) en el purín fue diseñada semi-abierta para permitir el intercambio del purín y por tanto al obtener un nivel aceptable de homogeneidad entre la composición de las deyecciones dentro y fuera de la campana (Figura 4.3). La parte superior, ciega se perforó y se alojó un conducto doble (input/output) de ventilación (4 mm \varnothing interior, Poliamida Rilsan Mebra Plastik,

Arsizio, Italia) para someterla a un flujo de aireación controlado (Bomba peristáltica, 1 L/h o 3,5 ml/cm²/h) que pretendió simular la ventilación natural de la superficie del purín. El aire entrante procedió del exterior de la nave mientras que la salida era muestreada de forma continua con la sistemática descrita en el apartado anterior. Las campanas se ubicaron por duplicado en cada una de las fosas de deyecciones y la determinación de las emisiones se efectuó tras siete días de llenado y 28 días de adaptación a la dieta.

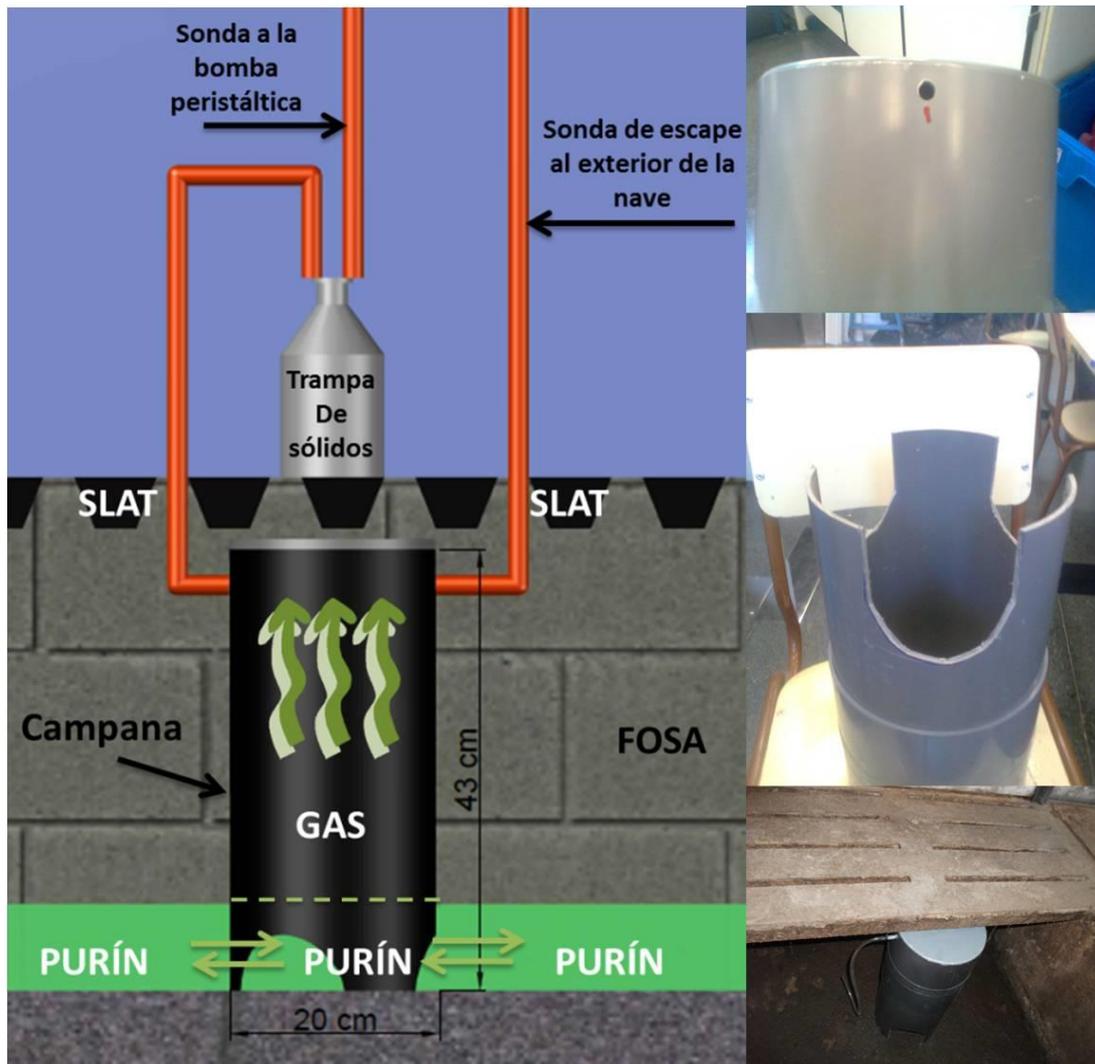


Figura 4.3. Ubicación de las campanas de flujo de aire constante (CFC) en fosa de deyecciones.

4.1.1.4. Ensayo previo: puesta a punto del procedimiento de medida.

4.1.1.4.1. *Animales.*

Los animales se manejaron de acuerdo con la Política Española de Protección Animal RD53/2013, atendiendo a los procedimientos de bienestar establecidos en la Directiva 2010/63/EU

(European Union Directive, 2010). Sesenta y cuatro machos enteros (Peso vivo inicial 33,6 s.e. 0,86 kg y 11 semanas de edad) fueron utilizados en este estudio (Abril, 2011). La genética utilizada fue, línea paterna Pietrain y línea materna, Landrace x Duroc.

4.1.1.4.2. Raciones.

El periodo de cebo se dividió en dos fases de 35 días [Fase I (35 a 70 kg) y II (71 a 110 kg)]. La ración (Tabla 4.1) para cada fase de cebo se formuló a partir de las necesidades (NRC, 1998), estableciendo los aportes para los diferentes ingredientes utilizados a partir de las tablas FEDNA (2010). El pienso se administró granulado (3 mm Ø).

Tabla 4.1. Ingredientes y sus proporciones (%) utilizadas en la ración experimental.

Ingredientes (% MF)	Fase	
	35-70 kg	71-100 kg
Cereales	63,2	77,7
Soja 47, Argentina (AG)	11,4	10,0
Harina de Galleta AG	11,0	
Colza AG	4,6	
Cilindro de Arroz AG	2,5	4,5
Grasas y aceites	1,8	3,3
Melaza de caña	1,0	1,0
Carbonato cálcico	1,04	1,20
Fosfato monocálcico	0,60	0,30
Sepiolita	1,00	0,60
Sal	0,40	0,44
Lisina 50 líquida	0,73	0,58
L-treonina	0,14	0,10
Metionina OH líquida	0,14	0,07
Triptófano	0,01	
Setnamix™ cerdos CC02/500FTU E15	0,20	0,20
Myco-Sorb	0,20	
Belfeed 5500	0,05	0,05

Vitamina y mineral SETNAMIX™ cerdos C/C 0,2% FIT-500 VIT E15 (kg): 6500 IU de vitamina A; 2000 IU de vitamina D3; 15 mg de α -tocoferol; $1,8 \times 10^{-2}$ mg de vitamina B12; 1,5 mg de vitamina B6; 4 mg de vitamina B2; 18 mg de ácido nicotínico; 9 mg de pentotenato cálcico; 37,5 mg de cloruro de colina; 17,3 mg de betaina anhidra; 100 mg de hierro (carbonato ferroso); 1 mg de iodo (yoduro potásico); 0,198 mg de cobalto (carbonato básico cobaltoso monohidratado); 15 mg de cobre (sulfato cúprico pentahidratado); 50 mg de manganeso (óxido de manganeso); 110 mg de zinc (óxido de zinc); 1,02% carbonato cálcico; 0,22 mg de selenio (selenito sódico); 2 mg de butilhidroxitolueno; 6,9 mg de ácido cítrico; 0,2 mg de citrato sódico; 200 mg de sepiolita; 500 FTU de 6-fitasa.

Tabla 4.2. Composición química estimada a partir de la composición de ingredientes (Tablas electrónicas FEDNA, 2010).

Composición (% sobre MF)	Fase	
	35-70 kg	71-100 kg
MS	88,95	88,92
Energía digestible (Mcal/kg)	3,227	3,193
Proteína bruta (PB)	15,500	14,469
Grasa bruta (GB)	4,693	3,916
Ácido Linoleico	0,957	0,871
Fibra bruta (FB)	3,955	4,028
Fibra ácido detergente (FAD)	5,609	5,233
Fibra neutro detergente (FND)	13,600	14,109
Almidón	41,364	44,321
Cenizas	6,054	5,235
Lisina	1,024	0,896
Triptófano	0,191	0,172
Metionina	0,342	0,274

4.1.1.4.3. Desarrollo experimental.

a) Parámetros productivos: Los animales fueron alimentados “*ad libitum*” con libre acceso al agua de bebida. Alimentos y agua consumida se registraron diariamente por corral. En el primer caso, el alimento consumido se determinó a partir del procedimiento de calibración de la tolva, que se basa en el descenso del alimento en la tolva a partir de la función:

$$y = 604,64x + 627,56; R^2 = 0,99;$$

Siendo: “*x*” representa la altura del alimento desaparecido en la tolva (cm) e “*y*” el alimento desaparecido o consumido (g). En el segundo caso, el agua se determinó mediante contadores de caudal (Tipo Ebro, Genebre 07, Barcelona, España). Los pesos y ritmos de crecimiento se determinaron por el pesaje individual de los animales [(Meier-Brakenberg, modelo 29, Brakenberg, Alemania), con monitor (F-star 125, Meier, Brakenberg, Alemania)] a los 0, 35 y 70 días del ensayo. Combinando consumos y pesos se determinaron los correspondientes índices de transformación.

b) Emisión gases: Los gases analizados en este ensayo previo de puesta a punto de la metodología fueron el amoníaco (NH₃) y metano (CH₄), y para determinar su emisión se diseñó un protocolo experimental que permitiese obtener medidas consistentes de los niveles de emisión gaseosa. A nivel de módulo se abordaron dos puntos fundamentales, obtener ventilaciones cuyos niveles de dilución del aire permitiese trabajar con concentraciones de los gases dentro de los límites analíticos de detección.

Un segundo punto a considerar fue obtener la técnica analítica más adecuada. Para ello en el caso del NH_3 se pusieron a punto dos metodologías: trampas de ácidos (H_2SO_4 , Ndegwa *et al.*, 2009) y sensores electroquímicos (MX6 iBrid™, Industrial Scientific Corporation, Oakdale, Estados Unidos) con sensor de detección para rangos de 0 a 500 ppm. El CH_4 se determinó por cromatografía de gases ajustando el procedimiento propuesto por Lopez y Newbold (2007), descrito en el apartado de determinaciones químicas (apartado: 4.1.2.6.3). De forma similar, en la emisión procedente de las deyecciones almacenadas en la fosa se fijó experimentalmente un nivel de aireación que permitiese, a su vez, registrar las diferentes concentraciones gaseosas de forma consistente y simular un nivel de aireación del purín similar al que su superficie recibe en la fosa. En relación al tiempo de llenado de las fosas de deyecciones y considerando la variabilidad existente en bibliografía consultada se llegó al compromiso de trabajar con niveles de llenado constantes de 7 días. El tratamiento analítico de las muestras de los gases procedentes de las deyecciones fue idéntico al utilizado con los gases provenientes del módulo.

c) Volumen del purín. La cantidad de purín, de forma previa a su evacuación, se determinó por volumetría. Conocida la superficie de la fosa se realizaron mediciones de la profundidad del purín (8 mediciones en distintos puntos de la fosa) con una regla graduada. La profundidad media fue utilizada para estimar el volumen de purín generado.

d) Muestreo del purín. Diariamente se midió la temperatura de la fosa, sumergiendo el electrodo (Crison CM 35 μS , mS $^\circ\text{C}$ Meter, Barcelona, España) a una profundidad aproximada de 2 cm. Previo inicio y final del período de muestreo de gases, el purín fue muestreado mediante un tubo colector de vacío manual que permite muestrear el perfil vertical completo de la fosa, por cada módulo/fosa se tomaron 20 sub-muestras (≈ 50 ml/muestra) que fueron mezcladas, se midió el pH (pHmetro Crisol pH-meter 2000, Crisol Instruments, Barcelona, España) y posteriormente fueron sub-muestreadas.

4.1.2. Emisión potencial de biogás del purín: Procedimiento de optimización.

Establecidas las medidas de la emisión gaseosa de ambas fases, la entérica y deyecciones, se procedió a determinar el potencial de emisión residual de gas del purín. Es decir, la cantidad de gas potencialmente emisible por las deyecciones durante su almacenamiento. Se utilizó como modelo el CH₄ y en este apartado se presenta una descripción completa del protocolo y las condiciones de experimentación utilizadas en este procedimiento.

Para estimar el potencial de emisión de biogás del purín se utilizó la técnica “*in vitro*” propuesta por Theodorou *et al.* (1994) mediante la cual se procede a la fermentación anaerobia de pequeñas cantidades de MS a 39°C, controlando la acidez del medio (pH) mediante la utilización de tampones carbonato y evacuando la emisión de gas a tiempos discretos. Para optimizar temporalmente el proceso se modificó la concentración del purín [**inóculo**], para ello se añadieron diferentes cantidades y tipos de carbohidratos estructurales [**sustratos**] procedentes de subproductos agrícolas (pulpas de remolacha y manzana, junto con paja de cereales), considerando que la presencia de carbohidratos no-estructurales [almidones] en el purín debería ser mínima dada la elevada tasa de digestibilidad en porcino. Su presencia en todo caso se relaciona con la contaminación del purín, con restos rehusados de pienso. Finalmente en un intento de acelerar los procesos de síntesis de CH₄ (metanización) del sustrato, los medios de cultivo conteniendo el purín y los tampones se enriquecieron con arqueas exógenas [**co-inóculo**] procedentes de heces frescas bovinas liofilizadas.

4.1.2.1. Inóculo.

Como inóculo, se utilizó purín artificial elaborado a partir de una mezcla de heces frescas y orina para conseguir un inóculo con una concentración de materia seca del 10% [Pur10]. Las deyecciones se obtuvieron en el Centre d'Estudis Porcins; Torrelameu a partir cuatro hembras gestantes, alimentadas con un pienso comercial (ED: 3,124 Mcal/kg; PB: 14%). Heces y orina se recogieron mediante extracción rectal (masaje en esfínter anal) y masaje continuo de la vulva (micción por estímulo), respectivamente. Las heces y orina, tras su colección se homogenizaron, muestrearon (10%) y conservaron (durante 24 horas a 4°C) hasta su utilización. A partir del purín original (Pur10) se realizaron tres diluciones, para conseguir concentraciones del 2, 4 y 6%, utilizando diferentes proporciones (20:80, 40:60 y 60:40 en 60 ml) del tampón (Fondevila y Pérez Espés, 2008) (Tabla 4.3).

Tabla 4.3. Composición de los medios de incubación diseñada para las tres concentraciones de purín original (Pur10).

Relación (Purín/Tampón)	20:80	40:60	60:40
Tampón, ml	170	128	85
Solución Macro mineral, ml	170	128	85
Agua[†], ml	425	319	213
Purín^{††}, ml	200	400	600
Reductor, ml	35	27	18

[†] Aporte adicional de agua destilada;

^{††} Mezcla artificial de heces frescas y orina (al 10% MS)

4.1.2.2. Co-inóculo.

Como co-inóculo, se utilizaron como aporte externo de arqueas heces frescas de vacuno lechero (Granja San Jose Sa, Vencillon Huesca). Las heces se recogieron en fresco en granja y fueron inmediatamente liofilizadas. Tras este proceso, se procedió a su molienda y almacenaje en botes estancos hasta su utilización.

4.1.2.3. Sustratos.

Como sustrato, se utilizaron muestras de subproductos agrícolas de naturaleza fibrosa, pulpa de manzana (PM), pulpa de remolacha (PR) y paja de cereales (PCe). Las muestras se secaron (60°C, 48 h), se molieron en un molino de martillos (1 mm Ø) y se almacenaron en botes estancos hasta su utilización.

4.1.2.4. Desarrollo experimental.

Para la incubación de los diferentes medios se utilizaron botellas (108 unidades) de cristal (pírex), con una capacidad total de 160 ml y apertura interna (19 mm Ø), que una vez preparadas se cerraron con septos de butilo (13x19xH12, Rubber, Hilversum, Holanda) provistos con cápsulas de aluminio (20 mm Ø). Las tres combinaciones de purín:tampón fueron incubadas con heces de vacuno liofilizadas como co-inóculo, a tres niveles de inclusión de (0, 5 y 10%, respectivamente, en función de la MS del purín). Cada combinación, purín: co-inóculo, se incubó con 600 mg de los tres tipos de sustrato (PR, PM y PCe), cuya composición bromatológica se presenta en la Tabla 4.4.

Se utilizaron como blancos, las siguientes combinaciones: i) Tampón + purín; ii) Tampón + purín + co-inóculo al 5 de la MS; iii) Tampón + purín + co-inóculo al 10% de la MS.

Las botellas que contenían las diferentes combinaciones (inóculo/sustrato/co-inóculo) se incubaron a 39 ± 1 °C, por cuadruplicado durante 56 días. Los tratamientos se repitieron en 2 tandas, procediendo a los muestreos que se detallarán a continuación. El diseño fue factorial (3 x 3 x 3; dilución del purín, tipo de sustrato y concentración de co-inóculo).

Tabla 4.4. Composición bromatológica (% sobre MS) de los inóculos (Heces de vacuno y cerdo) y de los sustratos (paja de cereal, pulpas de manzana y remolacha).

Ítem	Inóculos		Sustratos		
	Vacuno	Porcino	Paja (PCe)	P. Manzana (PM)	P. Remolacha (PR)
MS (% MF)	92,2	93,7	93,4	92,6	91,9
MO	90,1	77,7	96,15	97,3	95,4
EE	2,27	2,22	0,99	3,71	0,69
PB	17,8	15,4	3,04	9,59	10,4
FB	29,2	20,2	43,6	35,4	20,1
FND	46,4	45,1	82,5	58,6	40,2
FAD	26,2	21,3	53,6	40,7	23,8

Composición en MS de la MF (g/100 g MF); composición bromatológica de la MS (g/100 g MS), de materia orgánica (MO), extracto etéreo (EE), proteína bruta (PB), grasa bruta (GB), fibra bruta (FB), fibra neutro detergente (FND) y fibra ácido detergente (FAD).

4.1.2.5. Preparación de los medios de incubación.

El día previo al inicio de la incubación o co-digestión de los sustratos se procedió al llenado de las botellas con las cantidades correspondientes de sustratos y co-inóculos. La solución de incubación se preparó según el protocolo inicial (Theodorou *et al.*, 1994), para ello las soluciones de incubación (con las tres concentraciones del purín, la solución tampón y la solución macro-mineral) fueron agitadas y calentadas hasta 39°C, bajo burbujeo constante de CO₂ (aprox. 15-30 minutos), se añadió el agente reductor y se procedió tras (*circa*) 15 minutos al llenado de las botellas correspondientes (60 ml/botella) (Tabla 4.5 y 4.6). Tras el llenado de las botellas se procedió a su sellado mediante los septos de butilo y cápsulas de aluminio en presencia de flujo constante de CO₂, se liberó la presión mediante punción con aguja hipodérmica a través del septo, y tras su agitado se procedió a iniciar la incubación en estufa a $39\pm 1,0$ °C.

Tabla 4.5. Composición del tampón mineral (Fondevila y Pérez Espés 2008).

Solución	g / L
Macrominerales	5,7 Na ₂ HPO ₄ 6,2 KH ₂ PO ₄ 0,6 MgSO ₄ .7 H ₂ O Agua destilada (hasta completar 1 L)
Tampón (pH neutro)	35 Na HCO ₃ 2 (NH ₄) HCO ₃ Agua destilada (hasta completar 1 L)
Solución reductora†	45,71 ml de NaOH 1 N, 8,86 g de L-Cisteína. Agua destilada (hasta completar 1 L)

† La mezcla se realizó según el orden descrito

Tabla 4.6. Concentración de inóculo (heces de cerdo, HC), sustrato y co-inóculo (Heces de vaca, HV) (mg/botella) utilizado en cada uno de los tratamientos experimentales y sus correspondientes blancos.

Relación purín: tampón	Tipo sustrato†	Sustrato	Co-inóculo	Inóculo
			H. Vacuno	H. Porcino
20:80 (2% MS)	Paja	600	60	1200
	Pulpa de manzana	600	60	1200
	Pulpa de remolacha	600	60	1200
	Paja	600	120	1200
	Pulpa de manzana	600	120	1200
	Pulpa de remolacha	600	120	1200
	Blanco	---	60	1200
	Blanco	---	120	1200
	Blanco	---	---	1200
40:60 (4% MS)	Paja	600	120	2400
	Pulpa de manzana	600	120	2400
	Pulpa de remolacha	600	120	2400
	Paja	600	240	2400
	Pulpa de manzana	600	240	2400
	Pulpa de remolacha	600	240	2400
	Blanco	---	120	2400
	Blanco	---	240	2400
	Blanco	---	---	2400
60:40 (6% MS)	Paja	600	180	3600
	Pulpa de manzana	600	180	3600
	Pulpa de remolacha	600	180	3600
	Paja	600	360	3600
	Pulpa de manzana	600	360	3600
	Pulpa de remolacha	600	360	3600
	Blanco	---	180	3600
	Blanco	---	360	3600
	Blanco	---	---	3600

† 4 botellas/tratamiento

4.1.2.6. Toma de muestras y conservación.

4.1.2.6.1. Muestreo de la fase gaseosa.

Durante el ciclo de incubación [56 días] se determinó la producción de gas de forma indirecta a partir de la presión (mBAR) registrada en el espacio de cabeza de las botellas mediante un manómetro portátil (DELTA OHM, HD2124.2, Caselle di Selvazzano, Italia) provisto de una sonda (TP704-2Bai DELTA OHM, Caselle di Selvazzano, Italia). Las determinaciones se realizaron diariamente los primeros 7 días, 2 veces por semana los siguientes 21 días, para posteriormente (28-56 días) realizar mediciones semanales.

Determinada la presión y restaurada la presión en el espacio de cabeza de las botellas se procedió a obtener [semanalmente] una muestra de dicho gas [2 botellas/réplicas/tratamiento y sus correspondientes blancos] para la determinación de la concentración de CH₄ en la muestra gaseosa. La muestra (≈ 0,6 ml) fue obtenida manualmente [1,0 ml, volumen: jeringuilla Hamilton Gustight® SYR 22/2"/2 1001SL, Hamilton Company, Reno, Nevada, Estados Unidos), la primera fracción (≈ 0,5 ml) fue despreciada y 0,1 ml de gas inyectado directamente y de forma inmediata en el cromatógrafo de gases.

4.1.2.6.2. Muestreo de la fase líquida.

Los días 0, 25 y 56 (2), se procedió a la apertura secuencial de las cuatro réplicas o botellas correspondientes a cada tratamiento. Para ello, se agitó suavemente el medio de cultivo y se determinó el pH (pHmetro Crisol Ph-meter 2000, Crisol Instruments, Barcelona, España). Una vez determinado el pH se procedió al fraccionamiento de la muestra, para ello, una primera alícuota (12 g) fue pesada, congelada (en N líquido) y almacenada a -80°C hasta su liofilización. Esta muestra se destinó al análisis microbiológico. El resto del contenido se filtró a través de un tamiz metálico (1 mm Ø) y del filtrado se tomaron dos muestras. La primera de ellas, 2 ml de purín fueron acidificados (0,8 ml. HCl; 0,5 N) y congelados (-20°C) para la determinación de la concentración de N-amoniaco.

La segunda muestra de purín (4 ml) fue mezclada con solución conservante [1 ml; 2 g/L de cloruro de mercurio, 20 ml/L ácido orto fosfórico y 2 g/L ácido 4-metilvalérico en agua destilada] y congelados (-20 °C) para posterior determinación de ácidos grasos volátiles (AGV). Ambas muestras se tomaron por duplicado. El ácido 4-metilvalérico fue utilizado como patrón interno.

4.1.2.6.3. Determinaciones químicas.

a) Principios inmediatos.

El contenido en MS (sustratos e inóculos) se determinó por desecación en estufa a 105°C hasta obtener un peso de muestra constante. El contenido de cenizas se determinó tras la incineración en horno mufla (550°C durante 4 h). La Proteína bruta (PB), Fibra bruta (FB) y Extracto etéreo (EE) se analizaron según el procedimiento propuesto por la AOAC (AOAC, 1990). FND y FAD se analizaron según el método propuesto por Van Soest (Van Soest *et al.*, 1991).

b) Ácidos grasos volátiles (AGV) y nitrógeno amoniacal.

La concentración de AGV en las muestras se determinó por cromatografía de gases a partir del procedimiento propuesto por Jouany (1982). Brevemente, las muestras fueron descongeladas y centrifugadas (1800 g, 10 min.) para trasvasar el sobrenadante a un tubo eppendorf 1,5 ml, donde se re-centrifugó (12,000 g, 4 min.) de forma previa a su inyección al cromatógrafo. Se utilizó un cromatógrafo (Agilent Technologies 7890A, Net Work GC System, Pekín Elmer, Boston, Estados Unidos), provisto de un detector de ionización en llama (FID), equipado con columna capilar (BP21 de 30 m x 0,25 mm D.I. x 0,25 µm). La inyección se realizó a un flujo de 35 ml/min. de hidrógeno, 350 ml/min. de aire, 25 ml/min de Helio en Make up y 1 ml/min. de Helio en columna, 250 °C en FID, y temperaturas variables en horno (ver Tabla 4.7). El tiempo total de inyección fue de 18 minutos. El contenido de AGV de la muestra se determinó a partir de la relación concentración AGV/área del pico, utilizando como referencia muestras conocidas de patrón (acético, propiónico, isobutírico, butírico, isovalérico y valérico). Los viales con el patrón se obtuvieron tras realizar las diluciones correspondientes de los patrones. Dichos viales fueron sometidos al mismo tratamiento que las muestras.

Tabla 4.7. Temperaturas empleadas en la rampa del horno del cromatógrafo utilizado para la determinación de los AGV.

°C/min.	Temperatura °C	Tiempo (min.)	Tiempo final (min.)
	150	0,2	0,2
3	165	0,2	5,4
25	230	10,0	18,0

El nitrógeno amoniacal se determinó por destilación a partir del procedimiento Kjeldahl (AOAC, 1990). El procedimiento se inicia con la destilación directa de la muestra con NaOH (30% V/V) en un equipo automático Kjeldahl PRO-NITRO 4000851, recogiendo la solución efluente en bórico (50 ml al 2%). Finalmente mediante un indicador [10 gotas de indicador: verde de bromocresol / rojo de metilo

hasta completar 150 ml de solución] se procede a la neutralización/titulación de las muestras mediante HCl (0,1 N). La concentración de N-NH₄⁺g/L se calculó a partir de la ecuación:

$$NH_4^+ (g/L) = (14,007 \times T \times F) / V;$$

Siendo: N-NH₄⁺ (concentración N-amoníacal g/L); 14,007 (Peso molecular del N), *T*: concentración HCl; 0,1 N; *F*: volumen de HCl utilizado; *V*: ml, muestra.

c) Metano.

El metano se analizó mediante cromatografía de gases utilizando el equipo descrito en el apartado anterior, utilizando una columna capilar 30 m x 0,32 mm D.I. (113-4332, GS-GASPRO, Agilen Technologies, Santa clara, United States), operando a 70°C para la columna, 150°C en el inyector y 200°C en el detector. El gas portador fue el helio (99,999% pureza) y el tiempo total de inyección fue de 1,8 minutos. El contenido de la muestra se determinó a partir de la relación concentración-CH₄/área del pico comparando con las áreas de los picos derivados de concentraciones conocidas de patrón. La obtención de los patrones se realizó utilizando una botella (120 ml a 39,5°C) con CO₂ cerrada, a la que se inyectó un volumen conocido (1-5 ml) de CH₄ puro (99,95% de pureza). De la mezcla obtenida de estos gases (CO₂ + CH₄) en la botella, se extrajo manualmente del espacio de cabeza diferentes volúmenes, despreciando parte del volumen y ajustando hasta 0,1, 0,3, 0,5, 0,7, 0,9 ml. que fueron inyectados inmediatamente al cromatógrafo. La curva de estándares se realizó para cada período muestreo de metano.

d) Aislamiento de ADN y cuantificación microbiana de bacterias, arqueas totales y arqueas metanogénicas hidrogenotróficas (AMH) por qPCR.

El ADN se extrajo utilizando un kit QIAamp DNA Stool Mini (Qiagen Ltd., West Sussex, Reino Unido) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN extraído se empleó para cuantificar bacterias totales, arqueas metanogénicas hidrogenotróficas (AMH) y acetoclásticas (*Methanosarcina* spp. y *Methanosaeta*) y evaluar la estructura de la comunidad de arqueas metanogénicas, para ello, el ADN se amplificó por qPCR utilizando cebadores específicos (Tabla 4.8; Denman *et al.*, 2007; Øvreås y Torsvik, 1998). El procedimiento de la qPCR varió en función de los grupos evaluados, las condiciones de la PCR para bacterias totales fueron [1 ciclo (95°C x 10 min.), 40 ciclos (95°C x 0,15 min.; 60°C x 0,10 min.; 72°C x 0,55 min.)], y para arqueas totales, metanogénicas hidrogenotróficas, *Methanosarcina* spp. y *Methanosaeta* [1 ciclo (95°C x 10,00 min.); 40 ciclos (95°C x 0,15 min.; 57°C x 0,10 min.; 72°C x 0,55 min.)]. La cuantificación de estos grupos metanógenos se llevó a cabo utilizando

el método 2^{-ΔCt} (Livak y Schmittgen, 2001). Los análisis se realizaron en un sistema táctil CGX96 PCR tiempo real (BioRad Laboratorios Inc., Hercules, CA, Estados Unidos).

Tabla 4.8. Autores y secuencia de cebadores utilizados.

Fuente	Objetivo	Cebador
Maeda <i>et al.</i> (2003)	Bacterias totales	A5'-GTGSTGCAYGGYTGTGTCGTC-3' R5'-ACGTCRTCCMCACCTTCCCC-3'
Denman <i>et al.</i> (2007)	Metanógenas hidrogenotróficas	A5'-TTCGGTGGATCDCARAGRGC-3' R5'-GBARGTCGAWCCGTAGAATCC-3'
Øvreås y Torsvik (1998)	Arqueas totales	A5'-AGGAATTGGCGGGGAGC A-3' R5'-BGGGTCTCGCTCGTTRCC-3'
Rowe <i>et al.</i> (2008)	<i>Methanosaeta</i>	A5'-GGGGTAGGGGTGAAATCTTGAATCCT-3' R5'-CG-GCGTTGAATCCAATTAACC GCA-3'
Franke-Whittle <i>et al.</i> (2009)	<i>Methanosarcina</i>	A5'-CCTATCAGGTAGTAGTGGGTGTAAT-3' R5'-CCCGGAGGACTGACCAAA-3'

e) Análisis de Biodiversidad de AMH.

El aislamiento del ADN se realizó según el procedimiento descrito en el apartado anterior. Para el análisis de DGGE, la región específica del gen ARNr 16S de arqueas se amplificó mediante PCR utilizando los cebadores descritos por Cheng *et al.* (2009). Las condiciones de amplificación usadas en la PCR fueron las siguientes: 1 ciclo (94°C durante 4 min.); 30 ciclos (94°C durante 1 min., 55°C durante 1 min., 72°C durante 1 min.); 1 ciclo (72°C durante 7 min.).

Para los estudios de biodiversidad, la DGGE de los productos de PCR (10 µl) se revelaron en geles con un 8% (w/v) de poliacrilamida TAE (40 mM de Tris base; 20 mM de ácido acético glacial y 1 mM de EDTA, pH 8,3), que contiene un 30-65% de gradiente desnaturizante (100% desnaturizante; 7 M de urea y 40% de formamida desionizada (v/v)). La electroforesis se realizó 80 V y temperatura constante (60 °C) durante 16 horas. Posteriormente el ADN se visualizó usando un kit Bio-Rad de tinción de plata siguiendo las instrucciones del fabricante. El gel se escaneó y la imagen se analizó con software de análisis de huella molecular (QuantityOne - BIO-RAD Lab, Inc.). Los perfiles de bandas DGGE se compararon mediante (UPGMA) y se mostraron gráficamente como un dendograma. La riqueza se estimó contando del número de bandas detectadas en cada perfil de DGGE, el índice Shannon se utilizó como un índice de diversidad, se estimó a partir del procedimiento descrito por Cox (Cox, 1979).

$$H = -\sum(\rho_i)(\ln \rho_i),$$

Siendo: ρ_i la proporción de un grupo específico de las bacterias en el total de microorganismos en las muestras, y i es el número total de especies. El índice de uniformidad fue calculado como: H / \ln número total de bandas en el gel.

4.2. Emisiones de GEI en cerdos.

4.2.1. Fase de Transición.

4.2.1.1. Instalaciones.

Los módulos de transición [2 Módulos] disponen de fosas y ventilación controlada individualmente (Ambitrol 100, modelo 103, Sistemas Electronics PROGRES S.A., Bellpuig, Lleida, España). Cada módulo está dividido, a su vez, en 8 corrales (1,07 x 1,27 m) con una capacidad de 5 animales/corral (0,22 m²/cerdo). Los corrales se ubican en 2 filas dentro de la sala, separados por un pasillo central (0,5 m), cada corral está dotado de un comedero de tolva (0,8 m x 0,3 m x 0,7 m: Tolva TR5, Rotecna, Lleida, España) para alimento seco y un bebedero con cazoleta (Easy Drinker MIDI, Rotecna, Lleida España) dispuestos, ambos, sobre el emparrillado de plástico.

4.2.1.2. Animales.

Los animales se manejaron de acuerdo con la Política Española de Protección Animal RD53/2013, atendiendo a los procedimientos de bienestar establecidos en la Directiva 2010/63/EU (European Union Directive, 2010). Se utilizaron 80 lechones enteros con un peso inicial de 8,6 s.e. 0,41 kg y cuatro semanas de edad (Inicio el 18 de febrero 2013). La genética utilizada fue, Landrace x Large-White.

4.2.1.3. Alimentación.

Simulando el protocolo utilizado en granjas comerciales, la transición se estableció en dos fases [Fase pre-estárter (14 días) y Fase estárter (14-42 días)]. Las raciones (Tabla 4.9) para cada fase se formularon a partir de las recomendaciones NRC (2012), estableciendo los aportes para los diferentes ingredientes a partir de las tablas FEDNA (FEDNA, 2010). El alimento se granuló (3 mm Ø).

Tabla 4.9. Composición de ingredientes de las raciones utilizadas.

Composición (% MS)	Fase	
	Pre-estárter	Estárter
Arroz extrusionado	5,0	
Cebada	8,0	15,0
Maíz	10,0	31,0
Trigo	36,5	27,0
Tota de soja extrusionada	9,5	19,0
Proteína animal (harina de pescado, plasma)	7,5	1,0
Suero de leche (dulce y re-engrasada)	15,0	
Levadura de cerveza	3,0	
Premix aminoácidos (Lys, Met, Thr, Trp y Val)	1,5	1,1
Premix vit. y aditivos	2,6	0,5
Fosfato	1,0	0,7
Carbonato		0,2
Sal		0,4
Sebo		3,5

Tabla 4.10. Composición química (% MS) de las raciones.

Ítem	Fase	
	Pre-estárter	Estárter
MS	89,0	86,72
Cenizas	5,73	3,64
PB	18,48	16,67
FND	10,33	9,90
EE	5,63	5,07

4.2.1.4. Procedimiento experimental.

a) *Parámetros productivos.*

Los animales fueron alimentados “*ad libitum*” con libre acceso al agua de bebida. Alimentos y agua consumidos se registraron semanal y diariamente, por corral, respectivamente. En el primer caso, el alimento consumido se determinó a partir de la oferta y el rehusado. En el segundo caso, el agua se determinó mediante contadores de caudal (Tipo Ebro, Genebre 07, Barcelona, España). Los pesos y ritmos de crecimiento se determinaron por el pesaje individual de los animales a los 0, 14, 28 y 42 días del ensayo, mediante báscula electrónica portátil (Iconix FX, Loadbars 600mm, Palmerston Norte, Nueva Zelanda), dotada de monitor digital (modelo FX41; ICONIX Palmerston Norte, Nueva Zelanda). Combinando consumos y pesos se determinaron los correspondientes índices de transformación.

b) Emisión en sala.

El sistema de renovación de aire dispuso de chimenea y extractor similar al descrito para salas de cebo (Apartado 4.1.1.1.), sin embargo, se aplicó una adaptación de la sección (Figura 4.4) para reducir el caudal de renovación y que este fuese constante y capaz de mantener las condiciones de temperatura y humedad requeridas por los animales a esta edad. La modificación consistió en reducir la luz de la chimenea de extracción y paralizar el extractor de la chimenea. Para dicha reducción se utilizó un cilindro de acero (2 mm grosor) de 8 cm de alto, dotado con una base sólida (40 cm Ø) abierta en su punto central para ensamblar un cilindro de acero de 10 cm de alto (10 cm Ø interior), y acoplar un extractor (TD-250/100, S & P; Sistemas de Ventilación S.L.U., Barcelona, España), la nueva salida de extracción fue 10 cm Ø (Figura 4.4). Las mediciones puntuales (relativas para 10 cm Ø) de la velocidad del aire se realizaron al inicio y final del período de muestreo de gas mediante anemómetro de hilo caliente (Apartado 4.1.1.2). Los niveles de aireación se mantuvieron constantes y el cálculo de la emisión gaseosa absoluta fue corregida en función de la temperatura exterior e interior del módulo experimental (las mediciones de temperatura y humedad relativa se realizaron a intervalos de 10 min.; ver Apartado 4.1.1.1).

b.1) Muestreo del aire. El muestreo se realizó tras 22 días de adaptación a la dieta estándar y 36 de llenado de la fosa, y según el protocolo descrito en el Apartado 4.1.1.2., variando únicamente el número de sub-muestras finales y su forma de colección (2 muestras en jeringas de 100 ml provistas de válvula de paso), tras su obtención fueron trasladadas al laboratorio para analizar: amoníaco (NH₃), metano (CH₄) y óxido nitroso (N₂O) mediante un analizador foto acústico (Osada *et al.*, 1998), estandarizado a 20 °C (INNOVA 1412, Photoacoustic Gas-Monitor Thermo, LumaSense Technologies, Santa Clara, Estados Unidos), con un límite de detección de 0,1, 0,2 y 0,03 ppm, respectivamente, y ajustados a temperatura ambiente. Previa su utilización los aparatos fueron calibrados con mezclas de gases a concentraciones conocidas.



Figura 4.4. Sistema de renovación de aire utilizado en salas de transición.

c) *Emisión en Fosa.*

Para determinar la emisión de gases procedentes de la fosa de deyecciones se procedió a utilizar campanas de flujo constante “CFC” (Apartado 4.1.1.3). Las campanas se ubicaron por duplicado en cada una de las fosas de deyecciones y, en este caso, la determinación de las emisiones se registró tras 36 días de llenado y 22 de adaptación a la dieta estándar. El sistema de muestreo y el tratamiento analítico de los gases analizados fue similar al descrito para el gas muestreado en sala.

4.2.1.5. Tratamiento purín.

El procedimiento de registro del volumen de purín producido fue similar al descrito en Apartado 4.1.1.4.3c. El período de colección se prolongó durante toda la fase de transición (36 días; Apartado 4.1.1.4.3d) y ello fue así para simular las condiciones de vaciado que se realizan en las explotaciones convencionales. Se tomaron dos muestras de purín (*circa* 1 L), una de ellas se destinó a la determinación del pH y temperatura, la segunda se almacenó a -20°C hasta su posterior utilización. Previo inicio y final del muestreo de gases, temperatura y pH del purín también fueron registrados.

4.2.1.6. Determinaciones químicas.

Las muestras de alimento se analizaron para determinar su contenido en MS, MO, EE, PB (AOAC, 2005) y la FND acorde a Van Soest *et al.* (1991) utilizando el sistema Fibertec 1020 (Foss Tecator, Höganäs, Suiza).

Las muestras de purín también fueron analizadas mediante los procedimientos habituales en aguas residuales (APHA, 1995); para ello se determinó la densidad aparente (estimación del peso, volumen y humedad gravimétrica de la muestra de purín), conductividad eléctrica (conductometría), pH (electrometría), MS (gravimetría a 105°C), N-amoniaco (titulación volumétrica), N-orgánico (método Kjeldahl), fósforo y potasio (espectrometría de absorción atómica con plasma). El valor fertilizante del purín fue calculado al multiplicar el contenido de nutrientes (N-P-K g/kg MS) en base MS por la densidad aparente del purín (Alvarez-Rodriguez *et al.*, 2013).

4.2.2. Fase de cebo: estudio del nivel de fibra y proteína de la ración sobre los parámetros productivos y niveles de GEI.

4.2.2.1. Animales.

Los animales se manejaron de acuerdo con la Política Española de Protección Animal RD53/2013, atendiendo a los procedimientos de bienestar establecidos en la Directiva 2010/63/EU (European Union Directive, 2010). Se utilizaron 64 machos enteros con un peso inicial de 13,81 s.e. 0,77 kg y seis semanas de edad (Inicio el 27 de febrero 2012). La genética utilizada fue, Landrace x Large-White.

4.2.2.2. Instalaciones.

Las instalaciones en las que se efectuó el estudio se describen en Apartado 4.1.1.1.

4.2.2.3. Raciones.

Simulando el protocolo utilizado en granjas comerciales, el cebo se estableció en tres fases de 35 días/ cada fase [Fase I (13 a 40 kg); Fase II (41 a 70 kg) y Fase III (71 a 100 kg)]. Los cerdos de cada módulo recibieron raciones experimentales formuladas siguiendo las recomendaciones NRC (NRC, 2012) en base a cereal y torta de soja como fuente de proteína bruta (PB). La pulpa de remolacha se utilizó como fuente de fibra (FND). Para cada fase experimental se formuló una ración control cuyos niveles de PB se redujeron progresivamente con la fase de crecimiento (18, 15,5 y 13,2% para las Fases I, II y III, respectivamente), y se utilizaron aminoácidos sintéticos (L-lisina, DL-metionina, L-treonina y L-triptófano) para cubrir los requerimientos nutricionales y el equilibrio de proteína ideal. Adicionalmente, en cada fase, la ración control (CTR) se incrementó en un 2, 3,5 y 5%, respectivamente (Fase I, II y III) de proteína bruta (AP), de fibra neutro detergente (AF) o de ambas (APAF). La composición (en base a las tablas FEDNA, 2010) y valor de los nutrientes analizados se muestran en Tabla 4.11 y 4.12, respectivamente. La presentación del alimento fue en harina con un tamaño de partícula medio de 2 mm (\emptyset).

Tabla 4.11. Ingredientes y aditivos (g/kg de MF) de las dietas en las 3 fases experimentales, difiriendo en el contenido de PB (alta, AP vs bajo, BP) y/o en contenido de FND (normal, NF vs alta, AF) provistas de 15 a 100 kg de PV.

Ítem	Fase de alimentación											
	I (15-40 kg)				II (41-70 kg)				III (71-100 kg)			
	AP		BP		AP		BP		AP		BP	
	NF	AF	NF	AF	NF	AF	NF	AF	NF	AF	NF	AF
Cebada	267	193	203	253	276	297	268	301	274	217	253	398
Harina de Soja 47%	265	266	217	199	246	186	156	102	226	114	90	16
Sorgo	260	52	151	59	205	-	227	-	200	-	101	-
Trigo	152	379	375	382	205	296	288	298	199	201	396	201
Harina de colza 00 35%	-	-	-	-	-	70	-	78	-	100	-	81
Maíz	-	-	-	-	-	16	-	95	60	173	101	152
Harina de girasol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	80	-	36
Pulpa de remolacha	-	53	-	50	-	53	-	50	-	50	-	50
Aceite de soja	-	3,1	-	3,2	-	8,6	-	6,9	-	9,9	-	8,7
Grasa mezcla 3/5	31,0	30,0	31,0	31,0	31,0	40,0	30,0	40,0	23,0	40,0	31	40,0
Carbonato cálcico	8,9	2,8	-	2,0	5,9	2,5	0,8	0,8	7,0	4,3	13,5	4,2
Fosfato monocálcico	5,5	9,0	9,1	8,1	6,3	6,1	7,5	7,1	4,2	3,4	6,3	5,5
Sepiolita	-	-	-	-	8,4	4,1	4,2	3,3	-	-	-	-
Vitamina-mineral premix ¹	4,1	4,1	4,1	4,1	4,4	4,4	4,4	4,4	4,5	4,5	4,5	4,5
Rehydra Pro® (ácidos orgánicos y surfactantes)	-	-	-	-	10,0	10,0	10,0	10,0	-	-	-	-
Cloruro de sodio	2,1	1,8	2,1	2,1	1,9	2,0	2,1	1,9	2,2	1,9	2,2	1,9
L-Lys, (PB 50%)	3,57	2,51	3,66	1,63	-	-	1,40	0,90	-	-	1,53	1,40
DL-Met, 88%	0,50	1,60	-	1,73	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Thr	0,30	1,10	3,96	1,22	-	5,29	-	-	-	-	-	-
L-Trp	-	1,08	-	1,21	-	-	-	0,82	-	0,50	-	-

¹ Vitamina y mineral premix para cerdos entre 15 y 40 kg PV (CN-A. Lechones Enz + Phy 0,5%) contenido (por kg completo de dieta): 8.000 IU de vitamina A; 800 IU de vitamina D₃; 40 mg de α -tocoferol; $2,4 \times 10^{-2}$ mg de vitamina B₁₂; 0,8 mg de vitamina B₁; 1,6 mg de vitamina B₆; 4 mg de vitamina B₂; 1,2 mg de vitamina K₃; 16 mg de ácido nicotínico; 8 mg de ácido pantoténico; 280 mg de colina; 0,08 mg de biotina; 0,4 mg de ácido fólico; 72 mg de Fe (FeCO₃); 0,32 mg de I (KI); 0,16 mg de Co (CoSO₄·7H₂O); 128 mg de Cu (CuSO₄·5H₂O); 23,8 mg de Mn (MnO); 80 mg de Zn (ZnO); 0,24 mg de Se (Na₂O₃Se); 0,264 mg de ácido cítrico; 600 FYT 6-Fitasa; 2.000 BGU de endo-(1,4)- β -glucanasa; 4.800 FXU de endo-(1,4)- β -xilana; 0,264 mg de etoxiquina.

Vitamina y mineral premix para cerdos entre 41 a 70 kg de PV (SETNAMIX TM engorde C/C 0,2% FIT-500 VIT E15) contenido (por kg completo de dieta): 6.250 IU de vitamina A; 1.920 IU de vitamina D₃; 14,4 mg de α -tocoferol; $1,7 \times 10^{-2}$ mg de vitamina B₁₂; 1,44 mg de vitamina B₆; 3,84 mg de vitamina B₂; 17,28 mg de ácido nicotínico; 8,64 mg de pentotenato cálcico; 36 mg de cloruro de colina; 16,6 mg de betaina anhidra; 96 mg de Fe (FeCO₃); 0,96 mg de I (KI); 0,19 mg de Co (2CoCO₃3Co(OH)₂.H₂O); 14,4 mg de Cu (CuSO₄.5H₂O); 48 mg de Mn (MnO); 105,6 mg de Zn (ZnO); 0,97% CaCO₃; 0,21 mg de Se (Na₂O₃Se); 1,92 mg de butil-hidroxitolueno; 6,62 mg de ácido cítrico; 0,19 mg de citrato de sodio; 192 mg de sepiolita; 480 FTU de 6-fitasa; 1,9 g de vitamina mineral premix; 0,5 g de Belfeed B 220 ® (xilanasa) y 2 g de Toxidex ® (inhibidor de micotoxinas).

Vitamina y mineral premix para cerdos entre 71 a 100 kg PV (NE-Engorde 0,2%) contenido (por kg completo de dieta): 6.500 IU de vitamina A; 2.000 IU de vitamina D₃; 15 mg de α -tocoferol; $1,8 \times 10^{-2}$ mg de vitamina B₁₂; 1,5 mg de vitamina B₆; 4 mg de vitamina B₂; 18 mg de ácido nicotínico; 9 mg de pentotenato cálcico; 37,5 mg de cloruro de colina; 17,28 mg de betaina anhidra; 100 mg de Fe (FeCO₃); 1 mg de I (KI); 0,198 mg de Co (2CoCO₃3Co(OH)₂.H₂O); 15 mg de Cu (CuSO₄.5H₂O); 50 mg de Mn (MnO); 110 mg de Zn (ZnO); 0,97% CaCO₃; 0,22 mg de Se (Na₂O₃Se); 2 mg de butil-hidroxitolueno; 6,9 mg de ácido cítrico; 0,2 mg de citrato de sodio; 200 mg de sepiolita; 500 FTU de 6-Fitasa; 2 g de vitamina mineral premix; 0,5 g of Belfeed B 220 ® (xilanasa) y 2 g de Toxidex ® (inhibidor de micotoxinas).

Tabla 4.12. Energía y composición de las dietas experimentales, difiriendo en contenido de PB (alta, AP vs bajo, BP) y/o FND (normal, NF vs alta, AF) de 6 a 21 semanas de edad (programa de 3 fases de alimentación) (valores analizados expresados en g/kg de MF a menos que se indique lo contrario).

Ítem	I (15 a 40 kg PV)				II (41 a 70 kg PV)				III (71 a 100 kg PV)			
	AP		BP		AP		BP		AP		BP	
	NF	AF	NF	AF	NF	AF	NF	AF	NF	AF	NF	AF
EM, ¹ kcal/kg			3.300				3.300					3.300
EN, ¹ kcal/kg			2.425				2.425					2.425
MS	891,0		887,0		883,0		883,0		890,0		887,0	
PB	197,5		172,0		173,0		151,5		175,0		125,5	
Lys total	13,8		11,6		10,3		9,1		10,0		6,7	
Lys ¹ DIS	10,1		8,6		7,9		6,5		7,3		5,0	
Dig N:DIS Lys ¹	23,6		23,0		26,1		27,1		30,5		30,2	
Met ¹ DIS	3,6		3,1		2,5		2,2		2,6		1,9	
Met + Cys ¹ DIS	5,5		5,0		5,3		4,6		5,4		4,1	
Thr ¹ DIS	6,8		7,8		8,3		4,5		5,5		3,6	
Trp ¹ DIS	2,7		2,5		2,0		2,0		2,2		1,3	
FND	120,0	140,6	123,2	153,7	130,0	173,5	125,7	162,3	122,6	174,7	134,6	166,5
FAD	36,2	40,6	35,4	43,1	44,3	50,7	32,0	51,5	35,0	66,4	30,6	56,3
FB	27,1	25,6	20,7	29,3	27,0	38,6	23,3	38,8	28,3	55,2	25,9	47,1
Almidón	380,1	382,9	379,6	398,8	384,0	374,0	444,3	380,2	416,8	360,9	471,9	425,8
AEE ²	49,0	49,7	47,8	47,8	49,2	60,4	44,8	64,2	41,9	66,8	46,1	60,0
Ash	66,1	55,5	48,1	50,7	66,9	44,2	46,0	47,7	46,5	48,2	62,6	46,3
P	6,4	6,6	5,8	6,4	6,1	6,0	5,7	6,1	5,2	5,5	4,8	5,5
K	7,1	7,4	5,5	6,6	6,2	6,0	5,3	5,3	6,0	5,9	4,3	4,5

¹EM, EN y Digestibilidad ileal estandarizada (DIS) de AA calculado según FEDNA (2010);

Dig N = N fecal digestible, calculado a partir del contenido de N analizado, la digestibilidad fecal del N y la digestibilidad ileal de Lys de los ingredientes del alimento (FEDNA, 2010).

²AEE = hidrólisis ácida del extracto de éter.

4.2.2.4. Desarrollo experimental.

a. *Ingestión voluntaria y niveles de crecimiento.*

Los animales tuvieron libre acceso al agua de bebida y el alimento fue suministrado *ad libitum*. La ingestión de agua (pH = 8,0; conductividad eléctrica = 485 $\mu\text{S}/\text{cm}$; concentración de sodio = 22,2 mg/L y cloro = 33,7 mg/L) y alimento se registró por corral, registrando diariamente el contaje de agua y pesando semanalmente el rehusado del alimento y comparándolo con la oferta. Cada semana se procedió al pesaje individual de los animales y a partir de dicho peso se estableció la ganancia media diaria (GMD) y el índice de transformación. Tras finalizar cada fase experimental se determinó el espesor de grasa dorsal (EGD) a nivel de la última costilla [Posición P2; a 6,5 cm de la línea dorsal] mediante equipo ultrasonido digital Renco (Renco Sonagrader 4,2; Renco Corporation, Minneapolis, Estados Unidos) (Cesaro *et al.*, 2013). La eficiencia energética fue calculada a partir de la relación entre la energía metabolizable ingerida (EM) y la suma de EM necesaria para mantenimiento y crecimiento según normas FEDNA (FEDNA, 2013).

b. *Balance de digestibilidad.*

Un total de 32 cerdos (8/cada ración experimental, 2 corrales de 4/cerdos por módulo) fueron seleccionados para evaluar la digestibilidad de las raciones ofertadas (en Fase I, II y III respectivamente). Cada período de evaluación (última semana de cada fase) tuvo una duración de 1 semana, 5 días de adaptación a la dieta marcada (2 g/kg MS, Cr_2O_3), seguidos por 2 días de extracciones rectales (6 extracciones a intervalos de 8 horas), las heces fueron mezcladas y almacenadas (-20°C) hasta su análisis.

La digestibilidad en los diferentes tramos del intestino grueso se analizó en la última fase (Fase III) del experimento y para ello se seleccionaron 16 animales (4/ ración experimental). Los animales se seleccionaron al azar y se procedió a su sacrificio previa la administración de Pentobarbital sódico (10 ml / vía venosa) que fue utilizado como anestésico. Tras el sacrificio de los animales, el tracto digestivo fue diseccionado, pesado y muestreado, obteniendo muestras del contenido cecal, colon medio y heces. El contenido digestivo fue extraído, se determinó su pH y se fraccionó en cuatro sub-muestras para realizar los siguientes análisis: microbiología (10 g ultracongelados a -80°C), AGV [4 g/muestra en 1 ml de solución conservante (apartado 4.1.2.6.2.) y almacenada a -20°C], NH_3 (2 g/muestra en 0,8 ml de HCl y almacenada a -20°C) y destinando el resto de las muestras al análisis de los principios inmediatos. En el contenido estomacal se determinó únicamente pH.

c. *Volumen y composición del purín generado.*

El procedimiento de medida y colección de purín fue descrito previamente (Apartado 4.1.1.4.3), aunque se modificaron el número y la destinación de muestras colectadas (5 L aprox.), una alícuota (1 L) para determinación inmediata de pH, temperatura y conductividad eléctrica. El resto se almacenó en alícuotas (1 L / alícuota) a -20°C, hasta su posterior análisis.

d. *Emisión de gases efecto invernadero (GEI).*

Se realizaron según el protocolo descrito en el Apartado 4.1.1.2 y 4.1.1.3, adaptando el muestreo y sistema analítico al descrito en apartado 4.2.1.3 (b.1), siempre tras 7 días de llenado de la fosa y 22 días de adaptación a dietas experimentales.

d.1. *Emisión potencial de metano de las deyecciones (purín) y heces de cerdo.*

d.1.1. *Evaluación del potencial de emisión de metano en las deyecciones:* Las muestras de purín se liofilizaron y la MS obtenida se diluyó al 4% (% sobre MS) a partir de la solución tampón descrita en Apartado 4.1.2.5. La preparación de las diluciones, condiciones de fermentación “*in vitro*” y determinaciones (producción de gas, concentraciones de CH₄, AGV, N-amoniaco y microbiología (titulación de arqueas) se llevaron a cabo según los procedimientos descritos en los apartados 4.1.2.4 - 4.1.2.6. En ningún caso se utilizaron co-inóculos o co-sustratos. Se tomaron tres muestras de cada fosa y las muestras se incubaron a su vez por triplicado. Los blancos estuvieron compuestos únicamente por tampón. Para el análisis de la evolución en la producción de gas (CH₄) se utilizó un modelo Gompertz propuesto por Lay *et al.* (1997).

d.1.2. *Evaluación del potencial de emisión de metano en heces:* En la última semana de cada Fase se obtuvieron muestras rectales de ocho animales que recibían cada una de las raciones experimentales (n = 32). Las muestras fueron liofilizadas y mezcladas para elaborar los purines artificiales que fueron digeridos-incubados anaeróbicamente tal como fue descrito en apartados anteriores (Apartado 4.1.2.).

Para el análisis de la evolución en la producción de gas (CH₄) se utilizó un modelo Gompertz propuesto por Lay *et al.* (1997).

e. *Sacrificio y composición de la canal.*

Finalizado el período experimental 48 animales fueron trasladados a un matadero comercial. Previo al sacrificio los animales permanecieron un período de 20 h en ayuno, aunque con acceso a

agua de bebida. Los animales fueron sacrificados bajo aturdimiento con CO₂ (Butina ApS, Holbaek, Dinamarca) según normativa europea (Reglamento [CE] N° 1099/2009 Del Consejo de 24 de septiembre de 2009). Tras pesar la canal en caliente se procedió a su clasificación automática AUTOFOM (SFK-Technology, Herlev, Dinamarca) y se determinó el espesor de grasa dorsal (EGD) a 6 cm de la línea media entre la 3^a y 4^a últimas costillas.

4.2.2.5. Determinaciones químicas.

Las muestras de alimento y heces fueron analizadas para materia seca (MS), materia orgánica (MO), proteína bruta (PB), fibra bruta (FB) y extracto etéreo (EE) de acuerdo con los procedimientos establecidos por la AOAC (AOAC, 1990). Fibra neutro detergente (FND) y fibra ácido detergente (FAD) se analizaron según método propuesto por Van Soest (Van Soest *et al.*, 1991). La concentración de carbohidratos (CHO) en las dietas y heces se calcularon a partir de la ecuación propuesta por Urriola y Stein (2012) [CHO = MS- (PB+EE+Ash)]. El contenido en lisina del alimento se determinó por HPLC utilizando un detector de Fluorescencia (método: PNT-M-109), el almidón por polarimetría (método: PNT-M-031). Las muestras de contenido cecal y colon fueron analizadas sólo para MS, PB y FND.

Las muestras de purín fueron evaluadas siguiendo los métodos convencionales para la evaluación de agua y aguas residuales (APHA, 1995). Los componentes físico-químicos evaluados y procedimiento para la evaluación del valor fertilizante se describen en apartado 4.2.1.6.

La concentración del marcador indigestible, el cromo (Cr) en alimentos y el quilo obtenido en diferentes tramos del tracto digestivo (ciego, colon medio y recto) se analizó por espectrofotometría de absorción en plasma (AS-500 autosampler, Horiba Scientific, Madrid, España) a partir de la técnica propuesta por de Vega y Poppi (1997). La concentración de K y P en el purín se determinaron por espectrofotometría de masas (método PT-FQ-PU-06 y PT-FQ-PU-09, respectivamente).

La concentración de N-NH₃ en contenido cecal, colon y purín fue determinada por el método propuesto por Chaney y Marbach (1962) y la concentración de AGV se determinó de acuerdo con la técnica propuesta por Jouany (1982) [descrita en apartado 4.1.2.6.3 b].

4.2.2.6. Extracción de ADN y determinación de la concentración bacteriana de arqueas metanogénicas hidrogenotróficas y acetoclásticas (*Methanosarcina* spp. y *Methanosaeta*).

La extracción y determinación se realizó según fue descrita en los apartados 4.1.2.6.3d - 4.1.2.6.3e.

4.3. Cálculos y análisis estadístico.

4.3.1. Puesta a punto.

El tratamiento estadístico de los datos correspondientes a los siguientes parámetros, Peso vivo, Ganancia media diaria (GMD), Ingestión media (IMD) y el Índice de conversión (IC) se analizó mediante SAS V.9.3 (SAS Inst. Inc., Cary NC) en procedimiento PROC GLM, utilizando el modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + S_i + M_j + (S \times M)_{ij} + E_{ijk}$$

Siendo: Y_{ijk} , variable dependiente; μ , valor medio; S_i , fase de crecimiento (1 y 2); M_j , bloque (módulo estanco: 1 a 4); la interacción $(S \times M)_{ij}$ y el E_{ijk} , error experimental.

Los valores de emisión (en los módulos estancos [ME] y Fosas) diaria absoluta (g/animal), relativa al PV (mg/kgPV) o corregidas por el PV metabólico (mg/kgPV^{0,75}) se estimaron mediante la siguiente ecuación:

$$E = \left(\frac{(Cs - Ce) * V}{n} \right)$$

Siendo: E , la emisión (mg/n); Cs , la concentración ponderada a la salida del ME (mg/m³); Ce , la concentración ponderada a la entrada del ME (mg/m³); V , volumen de renovación de aire (m³/día) y n , la unidad de expresión (número de animales en ME, o unidades de masa en ME: kgPV o kgPV^{0,75}, volumen de purín (m³ en fosa) o área de fosa (m²).

El análisis de varianza de las diferencias entre tratamientos registradas en la emisión diaria de gases (CH₄ y NH₃) se realizó mediante el paquete estadístico SAS V.9.3 (SAS Inst. Inc., Cary NC), usando el procedimiento PROC MIXED, el día fue considerado como medida repetida, los datos se analizaron siguiendo el modelo:

$$Y_{ijkl} = \mu + F_i + D_j + M_k + E_{ijkl}$$

Siendo: Y_{ijkl} , variable dependiente; μ , valor medio; F_i , fase de crecimiento ($i = 1, 2$); D_j , días (1 y 2); M_k , bloque (módulos estanco: 1 a 4) y E_{ijkl} , el error experimental.

4.3.2. Producción potencial de CH₄ "in vitro".

Para transformar los valores de presión (y , mbar) a volumen de gas (x , ml), se estableció una función lineal ($R^2 = 0,9984$) a partir de la presión generada con volúmenes de aires conocidos, de esta forma la ecuación que se obtuvo fue la siguiente:

$$y = 11,46^{-1}x - 0,289;$$

Siendo: x , la presión (mbar) e y , volumen (ml).

El análisis de las diferencias entre tratamientos registradas en la producción de gas, CH₄ y la concentración de este último así como el pH fueron analizados estadísticamente mediante el paquete estadístico SAS V.9.3 (SAS Inst. Inc., Cary NC), procedimiento PROC MIXED, considerando día de muestreo (D) como medida repetida y las botellas dentro de cada bloque (B, tanda) como efecto aleatorio. El diseño se ajustó al siguiente modelo:

$$Y_{ijklms} = \mu + B_i + P_j + S_k + L_l + D_m + (B \times P)_{ij} + (B \times S)_{ik} + (B \times D)_{is} + (P \times S)_{jk} + (P \times D)_{js} + (P \times L)_{jl} + (S \times D)_{ks} + (L \times D)_{ls} + E_{ijklms}$$

Siendo: Y_{ijklms} , variable dependiente; μ , valor medio; B_i , efecto tanda (2 repeticiones o tandas); P_j , concentración de purín (20:80, 40:60 y 60:40); S_k , tipo de sustrato (blanco, paja de cereal y pulpas de manzana y remolacha); L_l , dosis de co-inóculo (0, 5 y 10%); D_m , períodos de muestreo (producción de gas y metano, las determinaciones se realizaron los días 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49 y 56) para las determinaciones de pH (días 0, 25 y 56); figuran también las interacciones dobles de los efectos principales y E_{ijklms} , el error experimental. En los parámetros químicos de fermentación (AGV, N-NH₄⁺) y la cuantificación bacteriana (qPCR) las determinaciones sólo se realizaron en una sola tanda de repetición.

Para el tratamiento de los resultados y análisis estadístico de las concentraciones de bacterias totales y arqueas metanogénicas se procedió a transformar el número de copias a su logaritmo [log₁₀]. Se determinó también la cuantificación relativa de arqueas así como la relación entre el número de copias del gen *mcrA* con respecto al número de copias del gen 16S rADN ($\Delta Ct = Ct_{AM} - Ct_{bacterias}$ totales).

Las diferencias estadísticas entre tratamientos se compararon mediante el test de Tukey, y las diferencias se declararon como significativas a partir de $P < 0,05$. El nivel de correlación entre el número de copias del gen *mcrA* y la producción de CH₄ se determinó a partir del test no paramétrico de Spearman.

Para el análisis de la evolución de las producciones de CH₄ en los medios de incubación se utilizó un modelo Gompertz (Lay *et al.*, 1997). El modelo considera la duración del desfase inicial (λ) en la producción de metano (días); R , el ritmo fraccional de producción (en ml CH₄/gMO/día) y B_0 , el potencial máximo de producción (ml de CH₄/gMO).

$$B = B_0 * \text{Exp} \left\{ - \text{Exp} \left[\frac{R * e}{B_0} (\lambda - t) + 1 \right] \right\}$$

Siendo: B , es la producción acumulada de metano; λ , el desfase inicial; B_0 , la producción potencial de metano y R , la velocidad de producción.

Para comparar las estimaciones obtenidas a partir del modelo Gompertz y la producción real acumulada (día 56) se aplicó el Test de Tukey. Los datos fueron analizados mediante procedimiento PROC MIXED en SAS V.9.3 (SAS Inst. Inc., Cary NC), considerando la botella de cada bloque (B, tanda) como efecto aleatorio, el diseño se ajustó al modelo:

$$Y_{hijk} = \mu + B_h + S_i + M_j + E_{hijk}$$

Siendo: Y_{hijk} , la variable dependiente; μ , valor medio; B_h , efecto tanda (2 repeticiones o tandas); S_i , tipo de sustrato (blanco, paja de cereal y pulpas de manzana y remolacha); M_j , dosis de co-inóculo (0, 5 y 10%) y E_{hijk} , error.

4.3.3. Análisis correspondiente a la Fase de transición

El tratamiento estadístico de los datos correspondientes a la GMD, IMD e IC se realizó mediante el SAS V.9.3 (SAS Inst. Inc., Cary NC), procedimiento PROC GLM, utilizando el modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + S_i + M_j + (S \times M)_{ij} + E_{ijk}$$

Siendo: Y_{ijk} , variable dependiente; μ , valor medio; S_i , efecto semana (4, 6, 8 y 10); M_j , bloque (1 y 2); la interacción $(S \times M)_{ij}$ y el E_{ijk} , error.

Para analizar las diferencias en la evolución circadiana de la concentración de gases se utilizó el paquete estadístico en SAS V.9.3 (SAS Inst. Inc., Cary NC), procedimiento PROC MIXED, incluyendo el tiempo (h) como medida repetida según el modelo:

$$Y_{ijkl} = \mu + H_i + D_j + S_k + (H \times D)_{ij} + E_{ijkl}$$

Siendo: Y_{ijklm} , variable dependiente; μ , valor medio; H_i , horas de muestreo ($i = 3:00; 10:30; 13:30; 16:30$ y $19:30$); D_j , días de muestreo (1 y 2); S_k , sala: 1 y 2 (considerado como bloque); la interacción $(H \times D)_{ij}$ y el E_{ijkl} , error.

4.3.4. Efecto PB y FND sobre parámetros productivos y emisión gaseosa.

La digestibilidad aparente (%) de diferentes componentes de la ración (MS, MO, CHO, FND, EE y N-total) a nivel de ciego, colon medio y recto se determinó a partir de la concentración de marcador indigestible (Cr_2O_3) en la ración (CM_A) en relación a la concentración del marcador en las diferentes secciones del tracto digestivo (CM_X), según la siguiente ecuación:

$$\text{Digestibilidad aparente N, \%} = 100 [100 (CM_A / CM_X) (N_X / N_A)]$$

Siendo: N , nutriente; CM_A , concentración del marcador en el alimento (%); CM_X , concentración del marcador [en contenido de ciego, colon medio o recto] (%); N_X , concentración del nutriente [en contenido de ciego, colon medio o recto] (%); N_A , concentración del nutriente en el alimento (%).

Para el cálculo de la emisión de los gases (CH₄, NH₃ y N₂O) ajustados a la temperatura se utilizaron las siguientes ecuaciones:

i: Transformación ppm a mg/m³:

$$\text{Concentración (mg/m}^3\text{)} = [\text{Concentración (ppm)} \times \text{Peso molecular (g/mol)}] / 24,04 \text{ L/mol}$$

Siendo: 24,04 L/mol, (20°C y 1 atmósfera)

ii: Relación entre volumen de gas y temperatura ambiente:

$$\text{Volumen molar} = [(R \times T) / P]$$

Siendo: R , $8,2054 \times 10^{-2}$ (L/atm/ K⁻¹ mol⁻¹); T , temperatura en grados Kelvin; P , presión del gas (Atmósferas).

iii: Emisiones totales de GEI:

$$E_T = [(Q \times (C_s - C_e))] / V$$

Siendo: E_T = Emisión total [mg /d] para cada GEI; Q , caudal de la ventilación (sala) o en la bomba peristáltica (fosa) [m³/día y L/m², respectivamente]; C_s , concentración ponderada de cada gas a la salida de los módulos [mg/m³] para cada día de muestreo; C_e , concentración basal ponderada, exterior o de entrada de cada gas [mg/m³].

Las emisiones (GEI) de la fosa de deyecciones se calcularon con la ecuación siguiente:

$$E_F = [(Q \times A) \times (C_s - C_e)] / V$$

Siendo: E_F = Emisión en [mg / día] de cada gas; Q , caudal de la ventilación (sala= módulo estanco) o de la bomba peristáltica (fosa) [m³/d]; A , Área m² de la fosa de deyecciones; C_s , concentración ponderada de cada gas a la salida de las CFC [mg/m³]; C_e , concentración basal ponderada exterior o de entrada de cada gas [mg/m³].

La emisión entérica de gases se calculó con la ecuación siguiente:

$$E_E = E_T - E_F$$

Siendo: E_E , emisión entérica [mg/h/ kg PV^{0,75}]; E_T , emisión total [mg/h/ kg PV^{0,75}]; E_F , emisión en fosa [mg/h/ kg PV^{0,75}].

El valor fertilizante del purín fue calculado al multiplicar el contenido de nutrientes (N-P-K) en MS, por la densidad aparente en suspensión (Alvarez-Rodriguez *et al.*, 2013).

Los parámetros productivos (IMD, PV, GMD, IC, eficiencia energética y EGD), coeficiente de digestibilidad aparente y cantidad de nutrientes digeridos (MS, MO, PB, FND, EE y CHO) fueron

analizados según un análisis de varianza de medidas repetidas en procedimiento PROC MIXED. El diseño se ajustó al siguiente modelo:

$$Y_{ijklm} = \mu + P_i + A_j + PB_k + FND_l + (P \times PB)_{ij} + (P \times FND)_{il} + (PB \times FND)_{kl} + E_{ijklm}$$

Siendo: Y_{ijklm} , variable dependiente; μ , valor medio; P_i , efecto edad o período (i = semanas: 6 a 11, 12 a 16, 17 a 21); A_j , animal/grupo efecto aleatorio dentro del grupo j ; PB_k , efecto nivel de PB (k = AP, BP); FND_l , efecto del nivel de FND (l = AF, NF), y E_{ijklm} , error experimental.

Los coeficientes de digestibilidad aparente y cantidad de nutrientes digeridos (MS, PB y FND) en cada segmento del intestino grueso (ciego, colon medio y recto) a 21 semanas de edad, parámetros de fermentación (NH_3 , pH, concentración de AGV y sus proporciones molares) y población microbiana (absoluta: BT y AMH; relativa: AMH, *Methanosaeta* spp. y *Methanosarcina*) fueron analizados con el mismo procedimiento estadístico, aunque el efecto edad (período) fue eliminado y se incluyó el segmento intestinal como factor fijo.

Las características de la canal se analizaron mediante el paquete estadístico SAS V.9.3 (SAS Inst. Inc., Cary NC), mediante un modelo lineal (PROC GLM), considerando efectos fijos el nivel de PB, FND y su interacción, así como el PV a sacrificio como covariable. Las diferencias entre grupos de clasificación de canales se analizaron mediante la prueba de Chi-cuadrado (Procedimiento FREQ) del paquete estadístico SAS V.9.3 (SAS Inst. Inc., Cary NC).

El análisis estadístico de los valores relativos a las concentraciones de gases (NH_3 , N_2O y CH_4) se realizó utilizando el paquete estadístico SAS V.9.3 (SAS Inst. Inc., Cary NC) y el procedimiento PROC MIXED, considerando la hora de muestreo como medida repetida. El diseño se ajustó al siguiente modelo:

$$Y_{ijklm} = \mu + P_i + A_j + PB_k + FND_l + (P \times A)_{ij} + (P \times PB)_{ik} + (P \times FND)_{il} + (A \times PB)_{jk} + (A \times FND)_{jl} + (PB \times FND)_{kl} + (P \times A \times PB)_{ijk} + (P \times A \times FND)_{ijl} + E_{ijklm}$$

Siendo Y_{ijklm} , variable dependiente; μ , valor medio; P_i , efecto edad o período (i = semanas: 11, 16, 21), A_j , hora/grupo efecto aleatorio dentro del grupo j ; PB_k , efecto nivel de PB (k = AP, BP); FND_l , efecto del nivel de FND (l = AF, NF), se consideraron también las interacciones dobles y triples y E_{ijklm} , error experimental.

El análisis estadístico relativo a la emisión de gases se realizó a partir de la media ponderada para cada día de muestreo, los análisis se realizaron con el mismo modelo descrito previamente, pero considerando el día como medida repetida, y el período como efecto aleatorio.

La evolución de la producción de metano (*in vitro*) de las deyecciones y heces de cerdos (purín artificial) se analizó utilizando el modelo que mejor se ajustó a las curvas de producción (Gompertz), cuyos parámetros se describen en inciso b del apartado de análisis estadístico. Los parámetros calculados en el ajuste del modelo Gompertz y en la producción acumulada de CH₄ al día 56 fueron analizados mediante procedimiento PROC MIXED en SAS V.9.3 (SAS Inst. Inc., Cary NC), considerando como random la tanda (o repetición) dentro de la fase, el diseño se ajustó al siguiente modelo:

$$Y_{ghijk} = \mu + B_g + F_h + PB_i + FND_j + (FxPB)_{hi} + (FxFND)_{hj} + (PBxFND)_{ij} + (FxPBxFND)_{hij} + E_{ghijk}$$

Siendo: Y_{ghijk} , la variable dependiente; μ , valor medio; B_g , efecto tanda (3 repeticiones o tandas); F_h , efecto fase (1 a 3); PB_i , nivel de proteína (AP y BP); FND_j , nivel de FND (AF y NF); figuran también las interacciones dobles, triples y el E_{ghijk} , error experimental.

A causa de desigualdad de las diferencias el cálculo de los errores estándar y los grados de libertad se realizaron por el método Kenward-Roger. Las diferencias entre las medias mínimo cuadráticas fueron evaluadas por prueba de Tukey. Los datos se presentan como medias de mínimos cuadrados y sus errores estándar asociados. El nivel de significación se fijó en 0,05. Interacciones entre efectos fijos (segundo grado) no fueron retiradas de los modelos y ellas son comentadas específicamente al alcanzar relevancia estadística.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Estimación directa de la emisión de gases en instalaciones convencionales: Emisión entérica vs emisión de las deyecciones.

5.1.1. Condiciones de muestreo.

En la Figura 5.1.1 se presentan las variaciones diarias en la temperatura y humedad relativa registradas en los meses de Mayo a Julio, en los que se puso a punto el procedimiento experimental, se presenta también los días en los que se registraron precipitaciones y que, en general, coincidieron con los cambios más acusados en lo que respecta a temperatura y humedad relativa. Se presentan también los valores correspondientes a la temperatura registrada en el purín de la fosa.

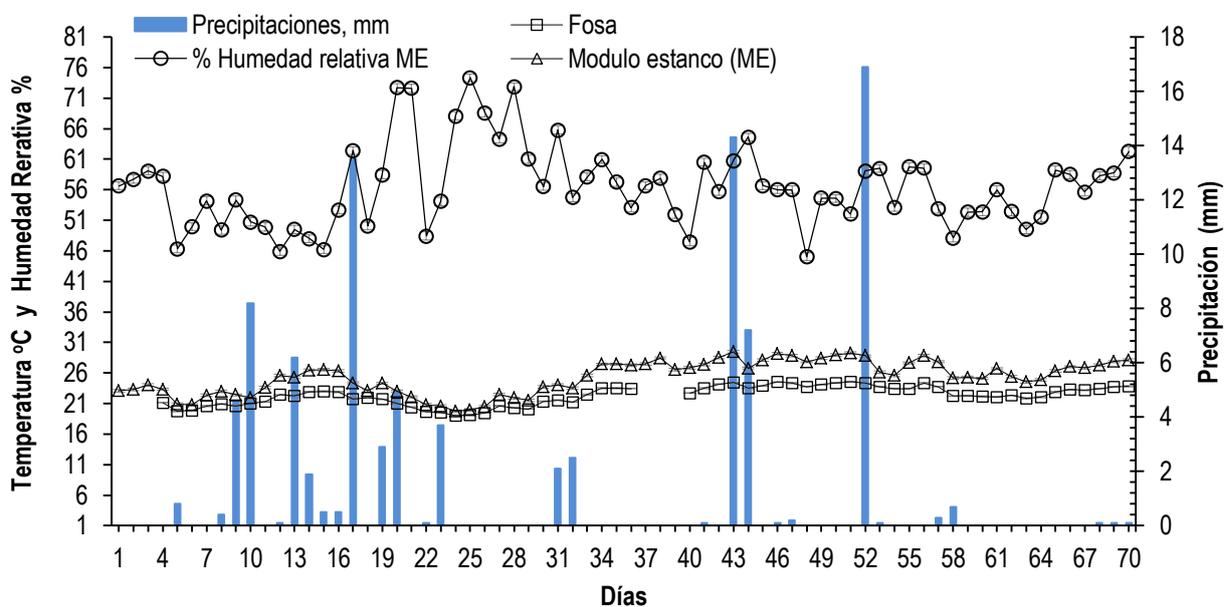


Figura 5.1.1. Temperatura (°C) y humedad relativa (%) registrada en los módulos estancos (ME), precipitaciones (mm o L/m²) registradas en el exterior de los ME y evolución de la temperatura en la fosa durante el ensayo [22 de mayo a 30 de julio 2011].

La emisión de gases (NH₃ y CH₄) se analizó y cuantificó durante 72 h consecutivas, las primeras 24 h se destinaron a equilibrar el sistema mientras que en las 48 h restantes se procedió a la cuantificación de la emisión gaseosa. Tal como se describe en el apartado 4.1.1.2 (Material y métodos), el muestreo y la cuantificación de la emisión de gases en los módulos estancos (ME) y en las fosas se realizó en períodos consecutivos, pero diferentes (i.e. la emisión gaseosa se realizó los días 21, 22 y 23 de Junio para el ambiente e inmediatamente después, los días 24, 25 y 26 las emisiones en fosa). La limitación en los canales de muestreo (ver cap. 4.1.1.2) nos imposibilitó realizar

de forma simultánea ambas determinaciones. Esta falta de simultaneidad podría resultar una fuente de error en la medida que los factores ambientales (principalmente temperatura) puedan afectar a la emisión de los diferentes gases objeto del presente estudio (Blanes-Vidal *et al.*, 2008; Saha *et al.*, 2010). No obstante en la Figura 5.1.1 se aprecia como la temperatura y probablemente el resto de las condiciones ambientales registradas en la fosa fueron bastante estables y por ello el error relativo a la falta de simultaneidad entre muestreos (Fosa vs ME) debería de tener escasa relevancia.

Los cambios medioambientales registrados dentro del período analizado (principalmente durante el mes de Junio) pudieron alterar la emisión gaseosa y sin duda, un muestreo y análisis continuo de dicha emisión nos permitiría analizar con mayor precisión los niveles de emisión. Sin embargo, el modelo de medida propuesto y las condiciones de estanqueidad que requiere es incompatible con el normal funcionamiento de la explotación (alimentación, limpieza, etc.), por tanto entre ambas opciones optamos por el muestreo discontinuo en el periodo final de cada fase de cebo manteniendo las condiciones “normalizadas” o comerciales de explotación.

Este último punto es crucial en el planteamiento del presente trabajo y por ello otra de las incertidumbres que se nos planteó en el diseño del protocolo experimental fue el periodo de llenado de la fosa. En este sentido, la variabilidad temporal existente es notable (Babot *et al.*, 2011) y atendiendo al planteamiento experimental y las condiciones físicas de la nave se decidió considerar un periodo fijo de llenado (de 7-10 días) para establecer los niveles de emisión gaseosa.

5.1.2. Animales: Parámetros productivos.

El tipo de animales, raciones y condiciones experimentales fueron descritos anteriormente (Apartado 4.1.1.4). En este apartado se presentan los índices productivos obtenidos con los híbridos comerciales y a los rangos de pesos en los que fueron obtenidos (Tabla 5.1.1).

Tabla 5.1.1. Resultados productivos [Pesos vivo (PV), Ganancia media diaria (GMD), Ingestión media diaria (IMD) y Índice de conversión (IC= relación pienso/ganancia] para cerdos en cebo, alimentados en dos fases con una ración convencional hasta 100 kg PV final.

Ítems	FI (33-62 kg)	FII (62-100 kg)	s.e.	Significación †
PV (kg) inicial en fase de alimentación	33,57 ^b	61,95 ^a	0,966	***
GMD (g/d)	810,0 ^b	1.058,6 ^a	18,845	***
IMD (kg/d)	1,82 ^b	2,57 ^a	0,042	***
IC (kg/kg)	2,30	2,48	0,068	ns

†. Efecto fase de crecimiento. ^(a,b) Superíndices diferentes indican diferencias estadísticas entre fases ($P < 0,05$).
ns = $P > 0,05$, *** = $P < 0,001$

Considerando la concentración energética de las raciones utilizadas (3.3 Mcal: FI y 3.2 Mcal: FII) los consumos medios registrados (1.820 g/d y 2.570 g/d) se corresponden con la ganancia media diaria (810 g/d FI y 1.060 g/d FII) y los índices de transformación (2,3 kg/kg FI y 2,48 kg/kg FII). Consumos, crecimiento e índices de transformación coinciden con los rangos descritos en la bibliografía referente a este sistema de producción (ADAS, 2007; Alvarez-Rodriguez *et al.*, 2013; Madrid *et al.*, 2013; Philippe *et al.*, 2011). Los animales fueron vacunados previo inicio del experimento, para Circovirus y Mycoplasma (Vacunas: Enterisol® Ileítis, Ingelvac CircoFlex® y Ingelvac MycoFlex®, respectivamente). En cualquier caso el tipo de animal, condiciones de alimentación y el patrón de crecimiento coincide, en general, con las condiciones convencionales descritas para este tipo de explotaciones con lo cual, consideraremos que los niveles de emisión registrados deberían de ser representativos de los que se registrarían en los cebaderos comerciales en los que reproducen este tipo de instalaciones.

5.1.3. Ventilación: Flujos de salida.

5.1.3.1. Módulos Estancos (ME).

La renovación de aire de las naves se realiza con un doble propósito, reducir la concentración de gases molestos o tóxicos ($\text{NH}_3 > 15$ ppm) que puedan afectar tanto a animales como a los operarios y, con temperaturas elevadas, refrigerar la nave. En nuestro caso el proceso de renovación de aire debía ser compatible con una detección consistente de los gases analizados. De esta forma, la intensidad de extracción se reguló mediante el incremento gradual (8, 10, 15, 20 y 30%) del extractor de cada uno de los ME. De esta forma para cada ME se determinó la correlación entre la potencia del extractor (x, %) y el flujo o velocidad del aire (y, m³). Las ecuaciones obtenidas para cada ME fueron las siguientes:

$$\text{ME 1: } y = 7,1702x + 4,419 \quad R^2 : 99,28$$

$$\text{ME 2: } y = 7,2207x + 3,4976 \quad R^2 : 99,97$$

$$\text{ME 3: } y = 6,3194x + 3,2295 \quad R^2 : 98,49$$

$$\text{ME 4: } y = 6,0461x + 5,7913 \quad R^2 : 99,60$$

En la Tabla 5.1.2 se presenta para cada ME, el potencial de utilización de los extractores y el flujo de aire resultante para cada fase de muestreo. Como se aprecia en la tabla el flujo medio de aire fue inferior en la FI (29,8 d.e. 2,1 m³/min) respecto al de la FII (32,9 d.e. 2,82 m³/min) y ello fue así por los incrementos en la temperatura media ambiental registrada que exigió una mayor ventilación de la nave y en segundo lugar por un incremento en el peso, ingestión y excreción de deyecciones en los

animales experimentales. En cualquier caso la concentración de los gases analizados, tanto cuando lo fueron por cromatografía de gases (CH₄) o por detección electro-químico (NH₃) se situaron dentro de los límites de detección establecidos tal como se describió en el Apartado 4.1.1.4.3.

Tabla 5.1.2. Potencia de extracción (potencia 0,26 Kw; caudal máximo 4000 m³/h) y flujo de aire registrado en los cuatro módulos estancos (ME) en ambas fases experimentales.

Ítems	Fase I		Fase II	
	% de la potencia	Flujo de aire (m ³ /h)	% de la potencia	Flujo de aire (m ³ /h)
ME 1	33	1.803,3	35	1.929,5
ME 2	32	1.785,7	34	1.911,3
ME 3	28	1.773,3	30	1.916,4
ME 4	30	1.811,4	32	1.961,0
Media estimada [†]		1.793,4		1.929,5
Media real [‡]		1.785,91 (d.e. 126)		1.975,8 (d.e. 169)

[†] Corresponde al valor medio calculado al aplicar ecuaciones de predicción obtenidas para cada ME,

[‡] Es el valor medio de las mediciones *in situ* de los ME.

En la Tabla 5.1.3 se presentan las condiciones ambientales, referidas a temperatura interior y exterior de los ME registradas durante los controles de ventilación. Citar que dichas condiciones se enmarcan, en lo que respecta a temperatura y humedad relativa del aire, dentro del rango normal en estas épocas de año: primavera principios de verano.

Tabla 5.1.3. Temperatura ambiente (T^a Exterior), interior (T^a Interior) y humedad relativa (H. Relativa) en cada uno de los módulos estancos (ME = 4).

Ítem	Fase I			Fase II		
	T ^a Exterior	T ^a Interior	H. Relativa	T ^a Exterior	T ^a Interior	H. Relativa
Módulo Estanco 1		23,28	55,3		27,13	55,0
ME 2		23,60	(†)		27,56	54,9
ME 3		23,11	57,7		27,15	57,1
ME 4		22,86	57,1		26,86	55,3
Media	20,9	23,21	56,7	26,6	27,18	55,6

(†); No registró la HR para él ME en la Fase I.

5.1.3.2. Campanas de flujo continuo (CFC).

La emisión de gases en las fosas de deyecciones de cada uno de los ME se realizó "*in situ*". Para ello se diseñaron las campanas de flujo continuo "CFC" (Apartado 4.1.1.3) que permitieron aislar una parte de la superficie del purín (283 cm²). Diferenciar las emisiones entéricas o digestivas de las procedentes de las deyecciones es una tarea que entraña ciertas dificultades, citar que en la mayoría de los trabajos existentes (Tabla 5.1.7) al respecto se basan en aislar una fracción discreta de purín y

mantenerla en condiciones aisladas de aerobiosis similares a la de la fosa y de esta manera se pretende simular los procesos de fermentación que acaecen en el purín. No obstante, en condiciones normales de almacenamiento el purín está sometido a un proceso de renovación constante en el cual las deyecciones recientes se adicionan de forma natural a las almacenadas en un proceso continuo que finaliza con el vaciado de la fosa. Mantener este intercambio de nutrientes constante fue el objetivo que se pretendió mediante el diseño de las campanas. Las CFC permitieron mantener la dinámica del purín dentro y fuera de la campana.

El segundo problema que se planteó fue como simular las condiciones de aerobiosis que se dan en la fosa de deyecciones, entendiendo la relación estrecha que existe entre los niveles de aerobiosis/anaerobiosis y la producción de CH₄. Y también en sentido contrario como la excesiva aireación del purín pueda activar a las bacterias ureolíticas e incrementar la producción de amoníaco (Aarnink *et al.*, 1996; Dourmad y Sève, 1997). Como balance entre ambos procesos se decidió mantener un flujo mínimo (1 L/h o 3,5 ml/cm²/h) que permitiese niveles de aireación que simulasen las condiciones de la fosa a la vez que permitiese una determinación analítica consistente de los gases analizados.

En Tabla 5.1.4 se presentan las condiciones físico-químicas registradas en el purín (i.e. pH, profundidad, temperatura y flujo de renovación), siempre tras un periodo de siete días de llenado/almacenamiento de deyecciones en la fosa. Señalar que las condiciones que se mantuvieron en las fosas fueron más constantes que las que se registraron en el ambiente. El nivel de pH tendió a la neutralidad y los niveles de aireación de la superficie del purín se situaron alrededor de los 35 L/m²/h.

Tabla 5.1.4. Valor medio de la temperatura, pH y profundidad del purín junto con el ritmo de aireación de las CFC, expresado L/m²/h (n = 4 Fosas).

Ítem	Fase I		Fase II	
	Valor	d.e.	Valor	d.e.
Temperatura en Fosa (°C)	24,79	0,84	25,55	0,81
Flujo de aire (L/m ² /h)	36,32	1,45	33,90	0,80
pH	7,24	0,07	7,35	0,07
Profundidad media (cm)	20,04	5,67	22,43	9,12

5.1.4. Protocolo de muestreo.

Tal como fue descrito en apartado 4.1.1.2, el aire exterior (sin contaminación o con mínimos que consideraremos como basales) y el expulsado (exhausto) fueron muestreados continuamente

mediante una bomba peristáltica. Las muestras se almacenaron a tiempos discretos (c/3 h) y en esta fase previa no se realizaron muestreos nocturnos. En la Figura 5.1.2 se aprecia la evolución circadiana que se registró en la concentración de metano (a) y amoníaco (b), respectivamente, en los ME y en las dos fases de cebo analizadas.

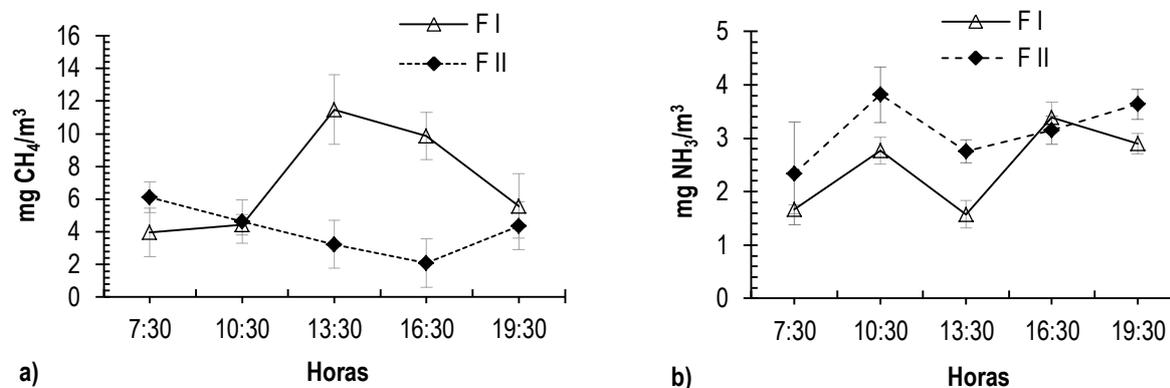


Figura 5.1.2. Evolución (n = 4 módulos) de la concentración diaria de CH₄ (a) y NH₃ (b) registrada a diferentes tiempos de muestreo, corresponde a dos fases de engorde de cerdos.

La concentración diaria de CH₄ y entre fases de cebo mostró un comportamiento variable, los valores medios en el caso del CH₄ para cada fase fueron de 5,77 y 3,76 s.e. 0,665 mg/m³ para la FI y FII, respectivamente. Respecto a las concentraciones de NH₃, también se apreciaron variaciones relevantes e irregulares a lo largo del día y entre fases. La concentración media de amoníaco en el ambiente incrementó con el peso-fase, las concentraciones medias fueron de 2,63 y 3,21 s.e. 0,367 mg/m³, para las FI y FII, respectivamente. En ambos casos los valores registrados se encontrarían dentro de las concentraciones consideradas como inocuas y muy por debajo del límite considerado tóxico del NH₃ (< 50 ppm, Babot y Rebuelta, 2009; Banhazi *et al.*, 2008).

Es necesario en este punto señalar que la concentración de gas en los ME va a estar determinada i) por los niveles de emisión y ii) por el nivel de ventilación del compartimento, el cual se incrementó con la fase de cebo. Considerando que el nivel de ventilación fue constante, es difícil especular sobre el origen de las variaciones registradas y podrían ser atribuidas a diversas razones relacionadas con el animal (ingestión, actividad, bebida, etc.) o el ambiente (temperatura, humedad relativa, viento, etc.) que incluiría factores de manejo (entrada de operarios, manipulaciones, etc.).

En cualquier caso las fluctuaciones en la concentración de gases son habituales y han sido descritas previamente (Jeppsson, 2002; Osada *et al.*, 1998). En los mismos términos se pueden expresar las variaciones registradas en la emisión de gases a partir de las deyecciones (CFC),

considerado dos salvedades, si se pretende comparar ambas concentraciones: la primera es el flujo de aire constante a través del sistema y en el segundo los menores niveles de ventilación utilizados. Dichas variaciones se presentan esquematizadas en la Figura 5.1.3.

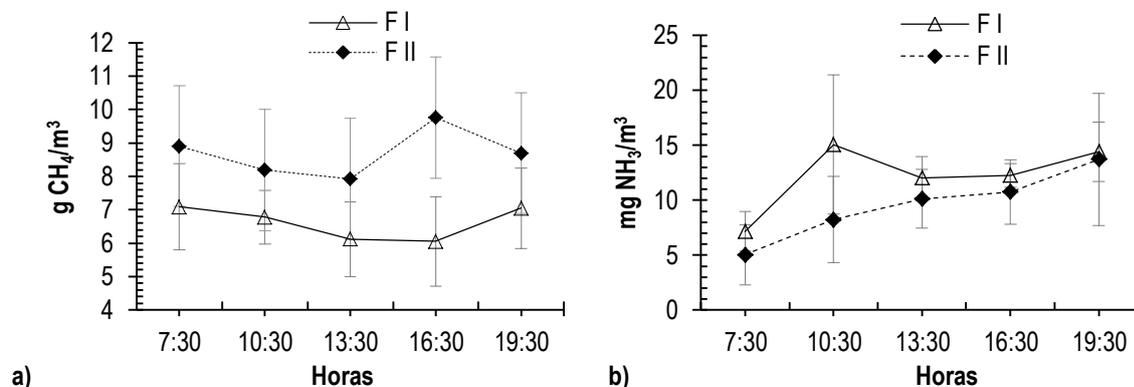


Figura 5.1.3. Evolución circadiana de la emisión de CH₄ (a) y NH₃ (b) de las deyecciones almacenadas en la fosa.

En la Figura 5.1.3 se muestra la evolución diaria en las concentraciones de amoníaco y metano procedente de la renovación del aire del espacio de cabeza de las CFC, la concentración media fue de 11,92 y 9,94 s.e. 2,835 mg/m³ en el caso del NH₃ y de 7,2 y 8,5 s.e. 1,41 g/m³ para el caso del CH₄ registradas en las fases de crecimiento I y II, respectivamente. Como cabía esperar las variaciones en las concentraciones registradas fueron menores dado que sólo deberían estar modificadas por aquellos factores capaces de alterar las condiciones de fermentación del purín (i.e. temperatura, pH, osmolaridad) aunque el ritmo de incorporación de material a la fosa (excretas, pienso o agua) pueda tener también su importancia al comparar las concentraciones registradas en ambas fases.

Las variaciones registradas en las concentraciones gaseosas en los ME y CFC muestran claramente el escaso valor de un muestreo puntual o parcial (≈ 3 h) si se pretende determinar los niveles de emisión total en un sistema abierto, convencional, como es nuestro caso. Es difícil suponer que la variabilidad registrada en los ME pueda ser debida al muestreo directo en chimenea, ni que un muestreo puntual pueda incrementar la precisión sobre colecciones continuas con intervalos de muestreo de 3 h. Considerando los resultados anteriormente expuestos se descartó la idea de muestreos puntuales o parciales para determinar la emisión gaseosa total y se optó en el resto de ensayos por colecciones continuas de gas, aunque ello suponga un mayor esfuerzo experimental.

Tabla 5.1.5. Emisión diaria de gases (NH₃ y CH₄), expresados en valores absolutos (g) o referidos al peso metabólico (mg/kgPV^{0,75}) registrada en los módulos estancos (ME) en los que se alojaron los animales, cerdos línea paterna Pietrain y línea materna, Landrace x Duroc alimentados con raciones convencionales a los 59,5 s.e. 1,08 kg (FI) y 96,8 s.e. 1,09 kg (FII).

Gas	Fase I		Fase II		s.e.		Significación de fase	
	g an/d	mg/kgPV ^{0,75}	g an/d	mg/kgPV ^{0,75}	g an/d	mg/kgPV ^{0,75}	g an/d	mg/kgPV ^{0,75}
NH ₃	7,02	318,2	10,10	321,1	1,34	45,12	ns	ns
CH ₄	15,70	712,6 ^a	11,56	366,5 ^b	1,96	87,49	0,05	***

Medias con superíndice diferentes (a,b) indican diferencia significativas entre fases de crecimiento (P<0,05). ns=P>0,05, ***=P<0,001

Tabla 5.1.6. Emisión de NH₃ (g an/d o mg/kg PV) obtenidos a partir de la bibliografía considerando los siguientes factores: métodos analíticos, nivel de proteína, tipo de suelo y temperatura.

Referencia	Tipo de suelo [Emparrillado]	Procedimiento Analítico	Peso vivo (kg)	PB (g/100 g MF)	Temperatura °C	Emisión	
						g an/d	mg/kg PV
Blanes-Vidal <i>et al.</i> (2008)	Parcial	Fotoacústico	86-122,5		17,4 s.e.0,5		121,9 s.e. 28,8
European Commission (2003)	Total		> 30			3,7 a 8,2	
	Parcial					2,5 a 6,6	
	Sólido o yacija					5,6 a 11	
Fernández <i>et al.</i> (1999)			51,1-107	19,2 -19,4	12,4 y 20,7	12,9-15,9	
Madrid <i>et al.</i> (2013)	Parcial	Infrarrojos	59,3-92,2	17,2-15,3	16,3-20,7		117,7
			60,6-94,7	15,5-15,1			94,2
			57,4-91,0	14,3-13,9			85,5
Osada <i>et al.</i> (1998)	Parcial	Fotoacústico	31,9-87,1		16,4 y 16,6	3,0 y 3,23	
Philippe <i>et al.</i> (2007a)	Total	Fotoacústico	23,4-110,2	18,1-15,6	20,5 s.e.1,0	4,98 s.e. 0,85	
Philippe <i>et al.</i> (2007b)	Total	Fotoacústico	23,8-111,7	18,1-15,3	20,5 s.e. 0,7	4,01 a 7,67	
Sun <i>et al.</i> (2010)	Parcial	Infrarrojos	20,0-120		18,2 s.e. 4		71-292†
	Total				18,8 s.e. 3,7		95,6-304,4†

† mg/kg PV^{0,75}

5.1.5. Emisiones de metano y amoníaco a partir de los módulos estancos (ME).

En las condiciones descritas previamente referidas a animales, condiciones y protocolo experimental, se presentan en la Tabla 5.1.5 las emisiones medias de CH₄ y NH₃ totales, obtenidas en los ME, en ella se aprecia como los niveles de emisión de NH₃ incrementaron con la edad de los animales, aunque al expresar los niveles de emisión por unidad de peso (Peso metabólico, PV^{0,75}), dichos valores se mantuvieron prácticamente constantes.

En este apartado se presentan los resultados relativos a las emisiones obtenidas con el protocolo experimental diseñado y descrito anteriormente (Apartado 4.1.1), y su magnitud se compara y válida con los valores previos propuestos en diferentes trabajos bibliográficos en los que también se han analizado las emisiones de gases contaminantes o con efecto invernadero, en condiciones experimentales similares a las propuestas en el presente trabajo. Inicialmente se comparan los resultados registrados con la emisión de NH₃ y en la Tabla 5.1.6 se presentan dichos valores. Analizando aquellos factores que puedan tener una incidencia directa sobre los resultados obtenidos (i.e. peso, nivel de PB de la ración, tipo de suelo, temperatura y procedimiento analítico). Dichos parámetros se detallan en la tabla.

Mayoritariamente los valores presentados se refieren a emisiones registradas en la fase de cebo con pesos iniciales entre los 30-50 y finales de 100 kg. Dentro de estas características productivas, el tipo de suelo del alojamiento o corral (emparrillado total, parcial y sin emparrillado o yacija) va tener una relevancia fundamental (European Commission, 2003). En nuestro caso las determinaciones se realizaron con un emparrillado parcial (52% de emparrillado) de los alojamientos; bajo estas consideraciones nuestros niveles de misión variaron en función de la fase de cebo, entre los 7,2 y 10,10 g/d o 117,9 y 104,4 mg/kg PV para pesos medios de 60 y 97 kg PV, se situaron en los rangos propuestos en bibliografía (2,5 - 18,2 g/d: European Commission, 2003; Fernández *et al.*, 1999; Madrid *et al.*, 2013; Osada *et al.*, 1998; Sun *et al.*, 2010), al expresar los niveles de emisión por unidad de peso vivo (PV) nuestros valores encajaron también entre los registros bibliográficos (71-151 mg/kg PV: Blanes-Vidal *et al.*, 2008; Madrid *et al.*, 2013) y también entre los registrados por kg PV^{0,75} (Sun *et al.*, 2010). De la tabla se desprende como la utilización de suelos totalmente emparrillados darán lugar a niveles de emisión más bajos (European Commission, 2003; Philippe *et al.*, 2007a) y la utilización de suelos sólidos o yacijas implica mayores valores de emisión (European Commission, 2003).

En relación al CH₄, los niveles emitidos por cerdos en cebo a los 60 y 97 kg PV se redujeron numéricamente (de 15,70 a 11,56 s.e. 1,96 g an/d) y dicha reducción alcanzó significación estadística

cuando los valores de emisión se corrigieron por el peso metabólico (de 713 a 367 s.e. 87,9; $P < 0,05$). Del mismo modo que en el caso del NH_3 , en la Tabla 5.1.7 se presentan los valores más relevantes publicados, considerando también aquellos factores que puedan ser más determinantes en dicha emisión. Se ha considerado, siguiendo un esquema similar al que se ha seguido para la emisión de amoníaco, las características del suelo de los módulos según la ocupación del suelo emparrillado, peso, temperatura y el procedimiento analítico. Por otra parte es importante señalar que la mayor parte de los trabajos publicados corresponden a ensayos en cámaras de respiración, y solo una pequeña parte de los resultados a los que hemos podido tener acceso se han obtenido en condiciones convencionales de producción. A pesar de ello los datos existentes se caracterizan por una elevada variabilidad, incluso cuando los valores de emisión se corrigen por el peso de los animales ($\text{mg/kg PV}^{0,75}$). Los niveles de emisión variaron entre los 16 (Jørgensen, 2007) y los 1.171 descritos por Philippe *et al.* (2007).

Tabla 5.1.7. Emisión de CH_4 ($\text{mg/kg PV}^{0,75}$ o mg/kg PV), obtenidos a partir de la bibliografía considerando los siguientes factores: métodos analíticos, nivel de fibra, tipo de piso y temperatura.

Referencia	Tipo de suelo Emparrillado	Procedimiento Analítico	Peso vivo (kg)	% FND	Temperatura °C	Emisión	
						$\text{mg/kg PV}^{0,75}$	mg/kg PV
Atakora <i>et al.</i> (2011)	Cámaras	Infrarrojos	81,2, 66,3 y 74,9	16,4, 22,6 y 24,1		630, 758 y 910	
Blanes-Vidal <i>et al.</i> (2008)	Parcial	Fotoacústico	86-122		17,4 s.e. 0,5		133 s.e. 45
Cao <i>et al.</i> (2013)	Cámaras	Cromatografía	58,7	20,1 y 23	21,5 s.e. 0,26	120 y 76 s.e.14	
Christensen y Thorbek (1987)	Cámaras	Fotoacústico	25-120	4,8 y 3,8 FB	18-22	101-241	
Costa y Guarino (2009)	Total	Fotoacústico			18,7 (15-21)		410
					27 (25,9-27,7)		386
					27,5 (23-33,5)		336
Dong <i>et al.</i> (2007) [†]	Parcial	Cromatografía	42-90		14-25		64,2 s.e. 23,4
European Commission (2003)	Total		(Peso x 65 kg)			334 a 523	
	Parcial					500 a 1.321	
	Yacija					108 a 130	
Ji <i>et al.</i> (2011)	Cámaras	Cromatografía	58,9 y 89,4	18 a 16,2	23,7 s.e. 3,74	53 y 69	
Jørgensen (2007)	Cámaras		28-94	2,8-40 FB		16-276	
Osada <i>et al.</i> (1998)	Parcial	Fotoacústico	31,9-87,1		16,4 y 16,6	368-192	
Philippe <i>et al.</i> (2007b)	Total	Fotoacústico	23,8-111,7		20,5 s.e. 0,7	1.171 a 532	

[†] Removiendo el estiércol sólido 2 veces/d

Citar también y en el mismo sentido que en las recomendaciones de European Commission (2003) los niveles de emisión podrían variar -teóricamente- para un animal con un peso vivo medio de 65 kg entre los 108 y 1.321 mg/kg PV^{0,75}. Factores tales como la madurez del digestivo, el tipo de suelo (como fase intermedia entre animal y sus deyecciones) y la composición de la ración pueden justificar gran parte de las diferencias registradas. No obstante, la variabilidad registrada justifica la necesidad de analizar dichas emisiones en las condiciones específicas que implican los sistemas de producción convencionales o comerciales, objetivo fundamental del ensayo.

En nuestro caso los niveles (mg/kg PV^{0,75}) registrados (de 712 a 336 para cerdos de 60 y 97 kg) se sitúan en el rango propuesto por European Commission (2003) utilizando suelos parcialmente emparrillados y estaría dentro del rango propuesto por diferentes autores (368 - 1.321: Atakora *et al.*, 2011; Costa y Guarino, 2009; Osada *et al.*, 1998; Philippe *et al.*, 2007b), aunque menores valores también han sido descritos (Blanes-Vidal *et al.*, 2008; Cao *et al.*, 2013; Jørgensen, 2007).

Coinciden los niveles medios, pero también una reducción significativa en los niveles de emisión cuando los resultados son expresados por kg de peso metabólico (Osada *et al.*, 1998; Philippe *et al.*, 2007b). Considerando que la producción de metano obedece al desarrollo de poblaciones microbianas, fundamentalmente arqueas metanogénicas que se desarrollan dentro del consorcio metanogénico y que actúan sinérgicamente con otro tipo de poblaciones celulíticas o hemi-celulolíticas, es difícil entender como la emisión de este gas relacionada siempre con la fermentación de fibra “potencialmente fermentable: FND” pueda disminuir con la edad del animal. Este punto, crucial para nuestro planteamiento experimental será estudiado y discutido en posteriores capítulos.

5.1.6. Emisiones de metano y amoníaco a partir de las campanas de flujo continuo (CFC).

En Tabla 5.1.8 se presentan los valores de emisión registrados en las CFC a partir de los cuales se estimó la emisión total de las fosas de almacenamiento de purín, las concentraciones registradas en el aire renovado de la CFC fueron superiores a los registrados en los ME, lo que confirmaría el aislamiento de los dos sistemas de recolección propuestos. Las emisiones de CH₄ registrado en el aire procedente de las CFC representan un 22 y 36% (Fases I y II, respectivamente) del total de metano registrado en los módulos estancos.

Señalar que los valores emitidos de NH₃ en deyecciones fueron bajos, muy inferiores a los registrados en los módulos estancos (< 1%), de hecho a partir del pH registrado en las deyecciones (7,24 - 7,35) la relación NH₃/NH₄⁺ sugeriría un desplazamiento del compuesto hacia su forma

Tabla 5.1.8. Emisión diaria de gases (NH₃ y CH₄), expresados en valores absolutos (g/d) o referidos al peso metabólico (mg/kgPV^{0,75}/d) procedente de las deyecciones almacenadas en la fosa. Las deyecciones procedieron de cerdos en cebo de línea paterna Pietrain y línea materna, Landrace x Duroc alimentados con raciones convencionales a los 59,5 s.e. 1,08 kg (FI) y 96,8 s.e. 1,09 kg (FII).

Gas	Fase I		Fase II		s.e.		Significación Fase †
	g/d	mg/kgPV ^{0,75}	g/d	mg/kgPV ^{0,75}	g/d	mg/kgPV ^{0,75}	
NH ₃	0,006	0,26	0,005	0,16	0,001	0,058	ns
CH ₄	3,39	153,2	4,13	129,9	0,628	22,95	ns

† Significación de la fase al expresar en valores absolutos (g an/d) o corregidos por el peso (mg/kgPV^{0,75})

Tabla 5.1.9. Emisión de NH₃ (g/m²) de las deyecciones obtenidas a partir de la bibliografía considerando los siguientes factores: métodos analíticos, nivel de PB, tipo de alojamiento y temperatura.

Referencia	Alojamiento	Procedimiento Analítico	PV (kg)	% PB	Temperatura °C	Flujo m/s	Emisión g/m ²
Amon <i>et al.</i> (2004)	Tanque	Espectroscopia		19 a 18	0 a 12	0,05-0,51	0 a 2†
Amon <i>et al.</i> (2007)	Tanque	Espectroscopia			16,4 y 17,9		1,32 y 2,36
Espagnol <i>et al.</i> (2008)	Tanque				19,3	0,01-0,1	0,21 a 0,31
Le <i>et al.</i> (2008)	Fosa	Trampas ácidas	56-117	12	19 s.e. 0,6 ME	504 L/m ² /h	1,12
				12			0,69
				12			0,95
				18			3,11
				18			2,68
				18			2,07
Le <i>et al.</i> (2008a)	Fosa	Trampas ácidas	41	14,8	21 s.e. 0,8 ME	504 L/m ² /h	1,21 s.e. 0,26
				15,4			0,95 s.e. 0,26
				16,1			1,12 s.e. 0,6
Le <i>et al.</i> (2009)	Fosa	Trampas ácidas	58	12	19 s.e. 0,6 ME	504 L/m ² /h	1,30 s.e. 0,26
				15			1,81 s.e. 0,34
Welford <i>et al.</i> (2003)	Cámaras		58-94	18 y 15	20	0,23 m ³ /h	0,20 a 0,41

†: valores de emisión expresados en g/m³; ME, módulo estanco.

protonizada (Palatsi, 2010a), muy soluble y con ello se justificaría la escasa volatilización del NH_3 registrada.

Ello indicaría también que la mayor parte del amoníaco emitido del módulo de cebo (ME) no tendría origen fecal y se generaría en aquellas zonas donde las condiciones ambientales permitieron mantener una elevada actividad ureásica: tales como aerobiosis, alcalinidad ($\text{pH} \approx 7,4$) y elevados niveles de presión hídrica. Sin duda estas condiciones no responden a las del purín y los mayores niveles de emisión se situarían en un entorno que podríamos determinar cómo “entre fases”, es decir todas las superficies de interacción entre aire y purín. En este sentido, es difícil contrastar nuestros resultados con la bibliografía existente dado que el protocolo utilizado difiere substancialmente de los que hemos podido encontrar en la literatura. En cualquier caso en la Tabla 5.1.9 se presentan las referencias más relevantes de los niveles de emisión de amoníaco en sistemas de fermentación cerrados “*in vitro*” o en condiciones abiertas como las que se discuten en el presente apartado.

De los resultados analizados se constata que existe una relación directa entre el nivel de aireación de una fosa y el nivel de producción de amoníaco, dadas las condiciones de aereobiosis que el proceso de amoniación requiere (Espagnol *et al.*, 2008), sin embargo, el efecto contrario limitaría la producción de metano. Por tanto, al decidir el caudal de renovación experimental del aire de cabeza de las CFC se buscó una solución de compromiso y se utilizó un nivel de renovación de aire de 35 $\text{L}/\text{m}^2/\text{h}$. Ritmo de renovación que pudo modificar la emisión de amoníaco (por sus bajos niveles de aireación), los niveles de emisión registrados (g/m^3 : 0,06 y 0,042, para FI y II, respectivamente) se situaron en el rango descrito por Amon *et al.* (2004) cuyas emisiones variaron entre 0 y 2 g/m^3 . Cuando los valores fueron expresados en g/m^2 (0,012 y 0,01, para FI y FII, respectivamente) los valores fueron inferiores a los trabajos previos de Le *et al.* (2008, 2008a y 2009) en los que se utilizan cámaras flotantes sobre la fosa con niveles de aireación de 0,5 L/min (0,69 a 3,11 g/m^2), incluso comparando con cámaras dinámicas para purín (0,2 a 0,41 g : Welford *et al.*, 2003), aunque en todos los casos los niveles de aireación fueron siempre superiores a los 0,7 $\text{L}^3/\text{m}^2/\text{s}^{-1}$.

Los niveles de emisión de CH_4 si fueron relevantes y explicaron entre el 22 y el 36% de la emisión total, siempre en las condiciones metodológicas descritas. Esto es, en los purines almacenados en las fosas de deyecciones, en un periodo comprendido entre los 7 a 10 días se dieron las condiciones de fermentación que permitieron sintetizar los niveles de CH_4 emitidos. Siguiendo la misma estructura que en el apartado anterior se presenta en la Tabla 5.1.10 las referencias más relevantes en la emisión de CH_4 en almacén, emisiones que deben ser interpretadas con las precauciones citadas previamente y que se refieren al procedimiento de colección.

Tabla 5.1.10. Emisión de CH₄ (g/m³ o g/m²) de las deyecciones obtenidos a partir de la bibliografía considerando los siguientes factores: procedimiento de muestreo, nivel de PB, temperatura.

Referencia	Almacén	Procedimiento analítico	PV (kg)	% PB	T °C	Caudal m/s	Emisión	
							g/m ³	g/m ²
Amon <i>et al.</i> (2004)	Balsa	Espectroscopia		19 a 18	0 a 12	0,05-0,51	1,48	
Amon <i>et al.</i> (2005)	Balsa	Espectroscopia						4,1
Amon <i>et al.</i> (2007)	Balsa				16,4 y 17,9	0,37	3,4 y 5	
Blanes-Vidal <i>et al.</i> (2008)	Cámara (7 d)	Fotoacústico	86-122		18,2	1,85 L/min	6,23 s.e. 1,4	
Clark <i>et al.</i> (2005)	Cámaras	Cromatografía	50-85	13,9-18,6		2 L/min	42	
Loyon <i>et al.</i> (2006)	Cámaras	Cromatografía					0,88 a 2,68	
Moset (2010ab)	Cámaras	Fotoacústico	21-fin	15,1	23,9 s.e. 1,85	0,3-1,03 m ³ /h	41,9 s.e. 0,86	4,8 a 12
Massé <i>et al.</i> (2003)	Cámara	Cromatografía			15		19,6 s.e. 11	17, s.e. 3,3
					10		8,66 s.e. 4,9	3,5 s.e. 1,8
Zhang <i>et al.</i> (2007)	Fosa	Cromatografía	500		8 a 32	0,3	30 s.e. 25	0,3 s.e. 0,5

Si guiendo un esquema similar al que se ha seguido en apartados anteriores, se han distinguido tres sistemas de almacenamiento del purín (fosa de deyecciones, cámaras dinámicas y balsas exteriores). Al expresar los niveles de emisión en relación al volumen de purín almacenado (g/m³) nuestros valores de emisión fueron de 31,2 y 33,8 s.e. 5,5 g/m³. Estos valores son similares a los determinados *in situ* (Zhang *et al.*, 2007) y serían claramente superiores a los registrados en cámaras de fermentación (Blanes-Vidal *et al.*, 2008; Loyon *et al.*, 2006; Massé *et al.*, 2003) o balsas (Amon *et al.*, 2004, 2005 y 2007), aunque algunos casos la optimización de los sistemas *in vitro* permiten registrar valores de emisión más elevados (Moset *et al.*, 2010ab).

5.2. Estimación de la capacidad potencial de emisión del purín: emisión de metano.

El purín de cerdo es una mezcla de deyecciones, que incluyen heces y orina junto con agua y residuos de alimento (Babot *et al.*, 2011) almacenados temporalmente en la fosa y de forma más permanente en las balsas. La hidratación del purín proviene principalmente de las orina, pero también en diferentes proporciones del agua de rehusado, de la limpieza de instalaciones y también pérdidas de bebederos. Además, los periodos de almacenamiento están condicionados por la estructura de la propia granja, gestión de la misma y las condiciones legales impuestas para su uso agrícola. Hecho que se traduce en una composición del purín muy heterogénea, en general, pero podemos considerar que en las granjas comerciales en España las concentraciones de MS del purín oscilan entre el 1 y 12% de MS y por tanto en el presente estudio acotaremos las concentraciones analizadas a un rango entre el 2 - 10% (g MS / 100g MF) en purines que no hayan sido excesivamente envejecidos.

Por ello, heces frescas fueron diluidas con orina hasta obtener una concentración al 10% MS, posteriormente, una segunda dilución con agua y soluciones tampón nos permitió obtener concentraciones de MS en el purín que variaron entre el 2 y el 6%. Para compensar la baja relación C/N del purín y mejorar el crecimiento bacteriano, el medio fue suplementado con subproductos ganaderos y agrícolas caracterizados por su contenido microbiológico y alta proporción de carbohidratos estructurales, respectivamente, asumiendo en el caso de los carbohidratos, que el almidón y fuentes no estructurales fueron previamente digeridos en el intestino del cerdo.

En relación a la metodología utilizada nos referiremos también a protocolos experimentales que sean de alguna forma comparables al protocolo establecido por Theodorou *et al.* (1994) y que se caracteriza básicamente por pretender la biodegradación vía anaerobia de un sustrato orgánico, con la producción máxima de metano (metanización) en un tipo de ensayo discontinuo que trabaja a 39 °C, utilizando pH tamponado y pequeñas cantidades de sustrato.

5.2.1. Efecto de la concentración del purín sobre la producción de gas y metano.

En la Figura 5.2.1 (a) se presenta la producción acumulada de gas y en la (b) la de metano a lo largo del periodo de incubación. En ambos casos, la emisión se vio afectada por la concentración inicial (g MS/100g MF) del purín ($P < 0,001$). Así la producción de gas fue superior en los purines más diluidos (2 y 4 vs 6%) y ello fue así a partir del día 28 de incubación. La adición al medio de diferentes tipos de carbohidratos estructurales interaccionó significativamente ($P < 0,0001$) con la generación de gas. Las pulpas (manzana y remolacha) mostraron una mayor producción en los purines más diluidos

[$P=0,005$ y $P<0,0001$ (2%); $P=0,0087$ y $P<0,0014$ (4% MS), respectivamente], mientras que las producciones registradas con la paja no se diferenciaron entre los niveles de dilución del purín ($P<0,0001$). En relación al metano, su producción acumulada sólo difirió numéricamente entre tratamientos (119,92, 136,84 y 105,86, ml/g MO para las concentraciones de 2, 4 y 6%, respectivamente).

La producción acumulada (T56) de CH_4 para las diferentes concentraciones de purín mostraron rendimientos equivalentes (Figura 5.2.1) a los registrados por autores que utilizaron una metodología similar, purín de cerdo con concentraciones que variaron entre el 6,3 y el 13,6% MS, aunque con periodos de incubación algo más prolongados (de 75-82 días: Campos *et al.*, 1999, 2000 y 2002). En la literatura existente podemos encontrar valores de producción de CH_4 superiores (290 - 490 ml/g MO; Jarret *et al.*, 2012), diferencias que deben ser explicadas por las condiciones metodológicas utilizadas, i.e. temperatura de incubación y concentración del inóculo. En este sentido Vedrenne *et al.* (2008) señalan que la producción de CH_4 pueden estar modificadas por la presencia de arqueas exógenas, concentración de MS, tipo de sustrato y el periodo de incubación.

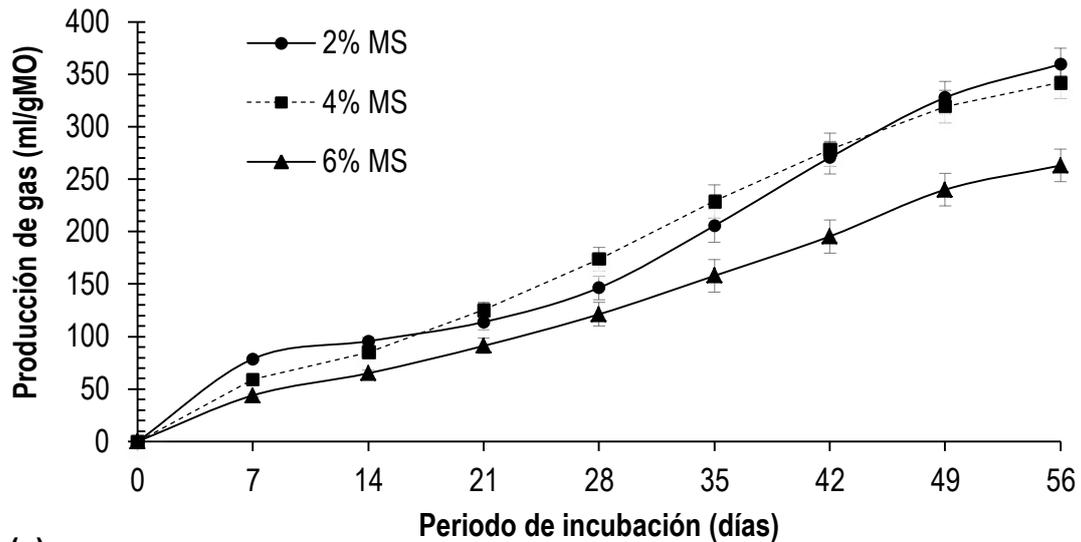
La relación entre producción de metano y concentración de purín no fue lineal, incluso numéricamente, y en ciertas fases del ciclo de producción los niveles más bajos de producción se correspondieron con las menores concentraciones.

Teóricamente, la mayor concentración de purín debería estar relacionada con una mayor cantidad de MO disponible (Møller *et al.*, 2004) o carga microbiana, siempre que un exceso en la concentración de MO o en sus productos de fermentación no limite la actividad de las arqueas metanogénicas (AM) (Jarret *et al.*, 2011; Santianes *et al.*, 2009). En este sentido el efecto positivo de la dilución del purín sobre la producción de CH_4 fue confirmado por Vedrenne *et al.* (2008) quienes demostraron un incremento en la producción de CH_4 y una reducción del tiempo de incubación al diluir con agua deyecciones de cerdas gestantes (del 3,23% al 1% MS) y de cerdos de engorde (del 10,1% al 3,95% MS inicial).

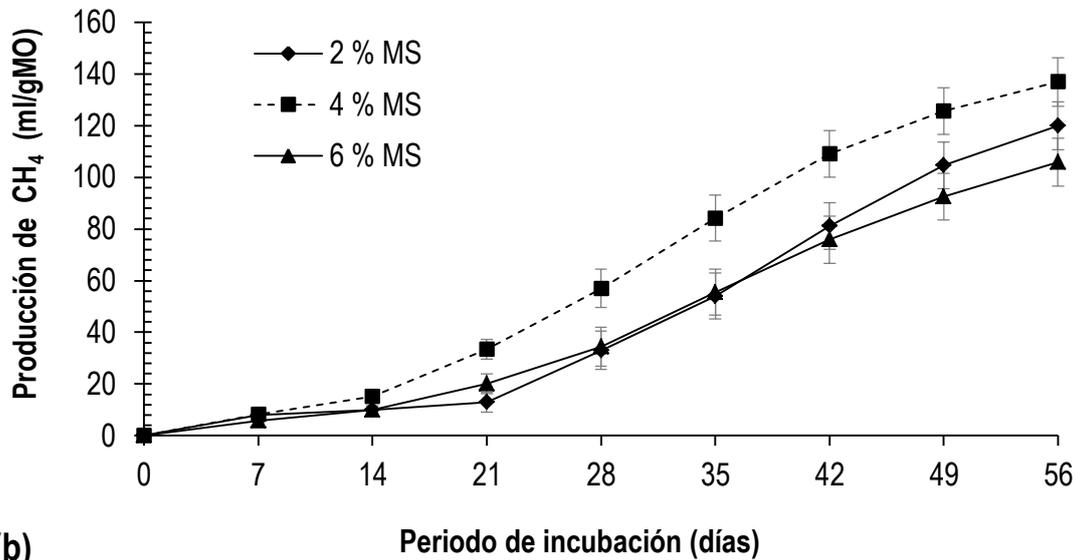
La presencia o concentración de lignina podría ser uno de los factores que explique la relación negativa entre concentración de MO y producción de CH_4 , la biodegradabilidad de los purines de cerdo dependerá del contenido de lignina, porque es resistente a su fermentación y porque reduce la disponibilidad de otros nutrientes (i.e. celulosa, Kaparaju y Rintala, 2005) y sus derivados (grupos aldehído) ejercen una potente toxicidad sobre las arqueas metanogénicas (Chen *et al.*, 2008). Otro factor determinante podría ser el pH, así Jarret *et al.* (2011) fermentando purines frescos a dos

diluciones acuosas (g MO/L; 38,8 y 8,9 g MO/L), obtuvieron un claro incremento en la producción de CH₄ acumulada, lo que relacionaron con las variaciones en los niveles de pH. El nivel de pH en el medio de incubación estará modulado por dos factores fundamentales, la acumulación de AGV que acidifican el medio y la acción alcalinizadora por el amoníaco derivado de la degradación de la urea y la proteína degradable (Campos, 2001; Flotats, 2010; Moset, 2009).

Por lo tanto, la menor producción de metano en las botellas conteniendo el purín más concentrado podría estar relacionada con el incremento en la concentración de N-NH₄⁺ y ello sería así por un aumento en la disponibilidad de proteína degradable (i.e. urea) en la MO. Se ha demostrado que concentraciones superiores a 3,3 g N-NH₄⁺ (1,1 g NH₃ libre/L) pueden inhibir la hidrólisis del sustrato (Vedrenne *et al.*, 2008), reduciendo el ritmo de crecimiento y actividad de la AM (Hansen *et al.*, 1998).



(a)



(b)

Figura 5.2.1. Evolución de la producción de gas (a) y metano (b) [ml/g MO] a lo largo del periodo de incubación. Los niveles de producción corresponden a los valores medios de cada concentración de purín (2, 4 y 6 g MS/100g MF, respectivamente) (Interacción concentración de purín x periodo de incubación).

5.2.2. Efecto del tipo de sustrato sobre la producción de gas y metano.

En la Figura 5.2.2 (a) se presenta la producción acumulada de gas y en la (b) la de metano para cada sustrato a lo largo del periodo de incubación. Aunque, entre los días 7 y 14 las botellas suplementadas con las pulpas mostraron una mayor producción de gas, a partir del 21 día la producción acumulada de gas no difirió entre sustratos ($P > 0,05$). La adición de sustrato mejoró la

producción de metano (ml/botella) y los incrementos registrados fueron de 295,71 y 361,11 para la paja y la pulpa de manzana, respecto al blanco (251,79). No obstante, al expresar los valores obtenidos por unidad de MO fermentada las diferencias se redujeron. Los niveles de producción acumulada fueron aparentemente superiores en la pulpa de manzana y la paja (138,59 y 132,25, respectivamente) que los valores registrados con los blancos (124,18 ml/g MO) y en todos los casos superiores a los valores registrados con la pulpa de remolacha (88,48 ml/g MO).

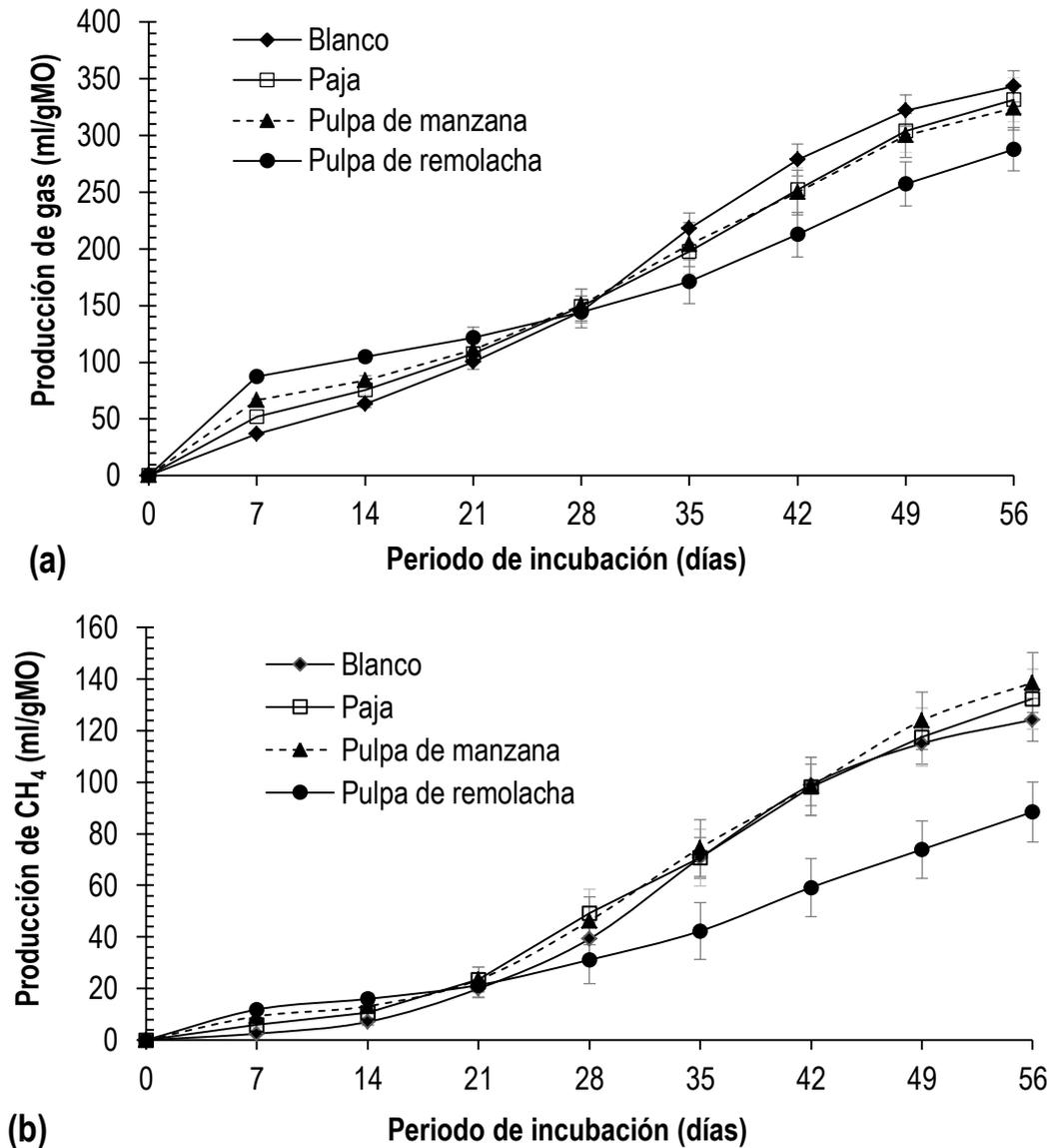


Figura 5.2.2. Producción (ml/g MO) de gas (a) y metano (b) a lo largo del periodo de incubación. Se presentan las concentraciones registradas para las botellas suplementadas con los diferentes sustratos (Interacción tipo de sustrato x periodo de incubación).

La producción media de CH₄ resultó modificada por la concentración de purín, de forma diferente según el tipo de sustrato (Tabla 5.2.1) (Interacción concentración de purín x tipo de sustrato; $P=0,014$),

sin embargo, cuando los valores medios se comparan entre las diferentes diluciones del purín dentro de cada sustrato y entre sustratos para cada concentración de purín las diferencias no alcanzaron relevancia estadística.

Tabla 5.2.1. Producción media de metano (ml/g MO) a lo largo del periodo de incubación. Los niveles de producción corresponden a los valores obtenidos para cada purín y sustrato suplementado (Interacción concentración de purín x tipo de sustrato). (Blanco; paja de cereal (PCe); pulpa de remolacha (PR) y manzana (PM).

MS en purín	Sustrato (Sus)				P-valor		
	Blanco	PCe	PM	PR	MS	Sus	MS x Sus
2%	53,42	57,84	60,83	39,64	0,009	0,050	0,014
4%	72,92	76,35	79,37	56,08			
6%	52,72	56,33	57,59	33,28			
s.e.	6,53		8,27				

Los residuos agrícolas por composición y precio son productos que pueden ser utilizados potencialmente para coayudar en la digestión anaerobia del purín, contienen una elevada concentración de sustancias degradables (carbohidratos de diferente naturaleza, lípidos y proteínas; Alkaya y Demirer, 2011), aunque en algunos casos (i.e. paja de cereales) están asociados a elevados contenidos de lignocelulosa y poseen elevadas tasas C/N, en este caso los rendimientos en metano, *per se* podrían ser bajos (Chen *et al.*, 2008). En el caso de las pulpas, aunque coinciden con la paja con una elevada tasa C/N, la naturaleza de los carbohidratos estructurales que las componen es diferente, poseen una elevada proporción de hemicelulosas y pectinas que son más degradables. Por tanto, la utilización de ciertos residuos agrícolas como una fuente externa de carbono en purines de cerdos, podrían mejorar el ritmo de producción y la producción de CH₄, en la medida que pudiesen aportar fracciones de MO fácilmente degradables y ello permitiría un crecimiento más sincronizado de la población microbiana. En este punto cabe señalar que la fracción más fácilmente digestible del purín lo ha sido previamente en el tracto digestivo del cerdo (Lehtomäki *et al.*, 2007). Aunque es cierto también que la introducción de un sustrato en el proceso de co-digestión anaerobia puede también acarrear problemas de inhibición del proceso de fermentación, en este caso por una excesiva sobrecarga orgánica (Campos, 2001).

5.2.3. Efecto del nivel de co-inóculo sobre la producción de gas y metano.

La utilización de heces de vaca como fuente adicional de arqueas (co-inóculo) no modificó ni la producción acumulada de gas ($P>0,05$) ni CH₄ ($P>0,05$), ni tampoco modificó su cinética de

producción. Estas diferencias sugieren que el purín (en las condiciones del presente ensayo) ya aportaría las poblaciones bacterianas (y arqueas metanogénicas) necesarias para la digestión anaerobia de la MO. En este sentido, nuestros resultados confirman trabajos previos de Vedrenne *et al.* (2008), quienes tampoco pudieron encontrar mejoras en la producción de CH₄ al co-inocular purines de cerdo (animales en cebo y cerdas gestantes) con un 10% de lodos de un digestor anaerobio. Sin embargo, dichos autores si observan un incremento en los parámetros cinéticos de fermentación, que coincidirían con las diferencias en la cinética de digestión entre el purín como sustrato único o co-inoculado con deyecciones de vaca, en lo que respecta al enriquecimiento de metano en el gas (Figura 5.2.3).

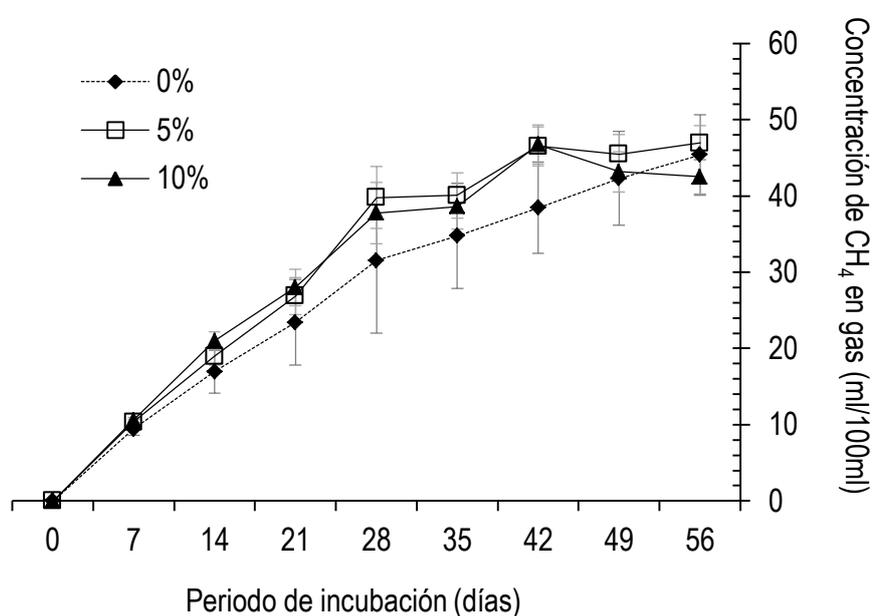


Figura 5.2.3. Enriquecimiento de CH₄ en el gas (ml/100ml) a lo largo del periodo de incubación. Se presentan las concentraciones registradas para botellas suplementadas con co-inóculo. (Interacción; nivel de co-inóculo x periodo de incubación).

5.2.4. Cambios en los niveles de pH y concentraciones de NH₄ y AGV en el medio de incubación a lo largo del periodo de incubación.

En el presente capítulo se presentan los valores medios relativos al nivel pH, concentración de N-amoniaco y AGV registrados en los diferentes medios de cultivo, y en qué medida dichos valores fueron modificados por los diferentes factores objeto del presente estudio. En la Tabla 5.2.2 se muestra dicha evolución y su relación con la dilución del purín y el tipo de sustrato utilizado como mejorador de la fermentación y su evolución a lo largo del ciclo de fermentación. Tal como se ha descrito

previamente (Apartado 4.1.2) se analizó también el efecto del co-inóculo, sin embargo, dada la escasa relevancia de dicho factor, su efecto fue obviado en la presentación de los resultados.

5.2.4.1. Acidez del medio (pH).

La acidez del medio fue modificada por la concentración del purín y dicho efecto estuvo a su vez modulado por el tipo de sustrato (Tabla 5.2.2, Interacción; concentración de purín x tipo de sustrato; $P<0,038$). Así en los purines más concentrados se apreció un descenso significativo en el pH cuando se suplementaron con PR en el caso del purín con un 4% de concentración y en ambas pulpas cuando la concentración del purín fue del 6% MS, siempre comparándolos contra los blancos correspondientes. En Figura 5.2.4 se esquematiza la evolución de la acidez de los medios de incubación a lo largo del periodo de incubación. El pH decreció hasta el día 25 para incrementar posteriormente hasta el día 56 ($P<0,001$), siendo dicha evolución más pronunciada en los medios suplementados (Interacción: periodo de incubación x tipo de sustrato; $P<0,01$).

En general, la elevada capacidad tampón de las deyecciones permite compensar la acidificación derivada del proceso de fermentación anaerobia (Vedrenne *et al.*, 2008), incluso aunque puedan producirse acumulaciones de ácidos importantes (Campos, 2001). En nuestro caso, los valores de pH se mantuvieron dentro de los rangos considerados apropiados para la co-digestión del purín (6,6 a 7,6; Carrillo, 2003), aunque los niveles de acidificación alcanzados con las pulpas fueron críticos. Este es el caso de la PM (6,74) y la PR (pH 6,43) a los 25 días de incubación. En ambos casos los niveles de pH, posteriormente se recuperaron (6,82 para PR y 7,19 para PM; T56, Figura 5.2.4).

Las pulpas se caracterizan por contener una elevada proporción de compuestos altamente fermentables (Alkaya y Demirer, 2011), de hidrólisis rápida (Ward *et al.*, 2008), lo que implicaría una rápida producción/acumulación tanto de AGV como de amoníaco libre (Hansen *et al.*, 1998), lo que podría dificultar el mantenimiento de un pH estable (Campos *et al.*, 1999; Campos, 2001) y alcanzar el medio un estado inhibitorio de los procesos fermentativos con la consiguiente reducción en la producción de CH₄ (Hansen *et al.*, 1998). En nuestro caso la recuperación del pH indicaría una recuperación del equilibrio iónico debido a la fermentación del sustrato (AGV) por la flora acetogénica y metanogénica (Jain *et al.*, 1982). En cualquier caso reducciones del pH similares a las registradas en nuestro trabajo, tenderían a inhibir la producción de metano y ello podría explicar las bajas producciones registradas con la pulpa (Berg y Pazciczki, 2006). El descenso en el pH registrado el día 25, fue más acusado en la PR que en la PM y las diferencias en este sentido fueron significativas. Los trabajos referentes a la co-digestión de la PM son escasos y con ello es difícil validar los resultados

obtenidos, los mayores contenidos en extracto etéreo y fibra más resistente a la fermentación (FAD) podrían ralentizar las producciones de AGV y explicar las menores variaciones en el pH registradas con la pulpa de manzana. Como referencia citar que en estudios de co-digestión de pulpa de pera inoculada con purín, mostraron variaciones en el pH similares a los registrado en el presente trabajo (Campos, 2001).

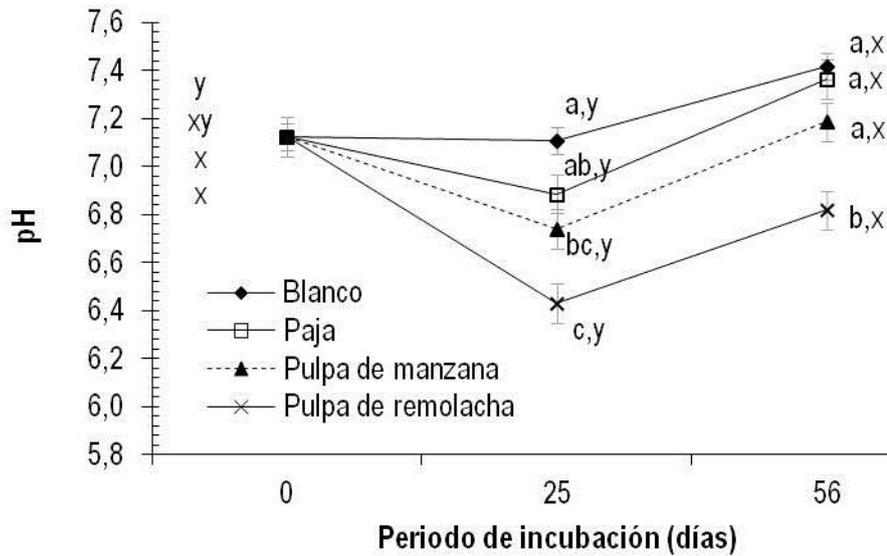


Figura 5.2.4. Valores medios de pH registrados para los diferentes suplementos (Blanco, B; Paja de cereal, PCe; Pulpa de manzana, PM y Pulpa de remolacha, PR) a lo largo del periodo de incubación (0, 25 y 56 días). Los índices (a, b, c), indican diferencias significativas ($P < 0,05$) entre sustratos y blancos. Los índices (x, y) diferencias ($P < 0,05$) dentro de cada sustrato durante el periodo de incubación.

5.2.4.2. Concentración de nitrógeno amoniacal ($N-NH_4^+$).

a. Cambios en la concentración de $N-NH_4^+$ inducida por la concentración de purín y el tipo de sustrato.

La concentración media de $N-NH_4^+$ en el medio de incubación mostró un rango de variación entre 1,18 a 3,02 g/L y fue modificada por el tratamiento experimental ($P < 0,05$). La concentración de N-amoniacal varió a lo largo del periodo de incubación con los purines más concentrados (2,57, 2,72 y 3,02 g/L: 6% MS y 1,58, 1,92 y 2,11 g/L: 4% MS, a 0, 25 y 56 días de incubación, respectivamente) siendo dichos cambios irrelevantes en el caso del purín más diluido (1,56, 1,18 y 1,22 en purín con 2% MS a 0, 25 y 56 días de incubación, respectivamente; Interacción: concentración de purín x periodo de incubación, $P < 0,01$).

La concentración de N-amoniácacal en purín también fue modulada por el tipo de sustrato, así los medios suplementados con PR y en los blancos la concentración de N-NH₄⁺ incrementó progresivamente con la concentración de MS, mientras que los medios suplementados con PCe y PM el incremento solo se registró cuando la concentración de purín aumentó del 4 a 6% de MS.

b. Cambios en la concentración de N-NH₄⁺ inducida por el nivel de co-inóculo.

La adición de heces de bovino liofilizadas como co-inóculo, al 5 y 10% respectivamente, no alteró en ningún caso la concentración media de N-amoniácacal (1,87 s.e. 0,09 vs 2,08 s.e. 0,04 y 1,99 s.e. 0,04 g N-NH₄⁺/L, para los blancos y tras la incorporación de 5 y 10% de co-inóculo en la MS incubada, respectivamente).

5.2.4.3. Evolución de los ácidos grasos volátiles (AGV) y sus proporciones molares.

La concentración (mM/L) en el medio original (12,7) se incrementó (28,8) en la apertura de la primera réplica (25 días), para disminuir posteriormente (6,1) cuando se abrió la segunda replica, coincidiendo con el final del proceso de incubación (56 días) (Tabla 5.2.2). Por otra parte las concentraciones de AGV durante el periodo de fermentación estuvieron determinadas por la dilución del purín (Interacción, concentración del purín x periodo de incubación: $P < 0,01$), así las mayores producciones de AGV (del día 0 al 25) se registraron con el purín más concentrado (6% MS) y los mayores ritmos de degradación/desaparición (entre los días 25 al 56) se observaron en el purín que presentaba una concentración intermedia (4% MS). Las concentraciones registradas en la proporción molar de AGV mayoritarios (i.e. acético, propiónico y butírico) se presentan en la Figura 5.2.5. Su evolución se caracterizó por un incremento (a diferentes ritmos) de la proporción de acetato en detrimento del resto, propiónico y butírico. Aunque este proceso estuvo mediado por la concentración del purín y el tipo de sustrato suplementado. Durante la fermentación del sustrato la proporción de acetato fue superior a la de propionato en los blancos y en las botellas suplementadas con paja (PCe) cuando se consideró únicamente las botellas que contenían el purín más diluido (2% MS; $P < 0,05$). Sin embargo, esta respuesta no pudo ser observada en los purines más concentrados (4 y 6% de MS), los cuales mantuvieron concentraciones similares para ambos AGV ($P > 0,05$).

Como se observa en la Figura 5.2.5 la proporción relativa de propionato fue prácticamente nula al final del periodo de incubación (56 días) para todos los sustratos cuando estos se adicionaron a los purín más concentrados, mientras que sí se observaron concentraciones significativas en las pulpas cuando se suplementaron al purín más diluido (2% MS).

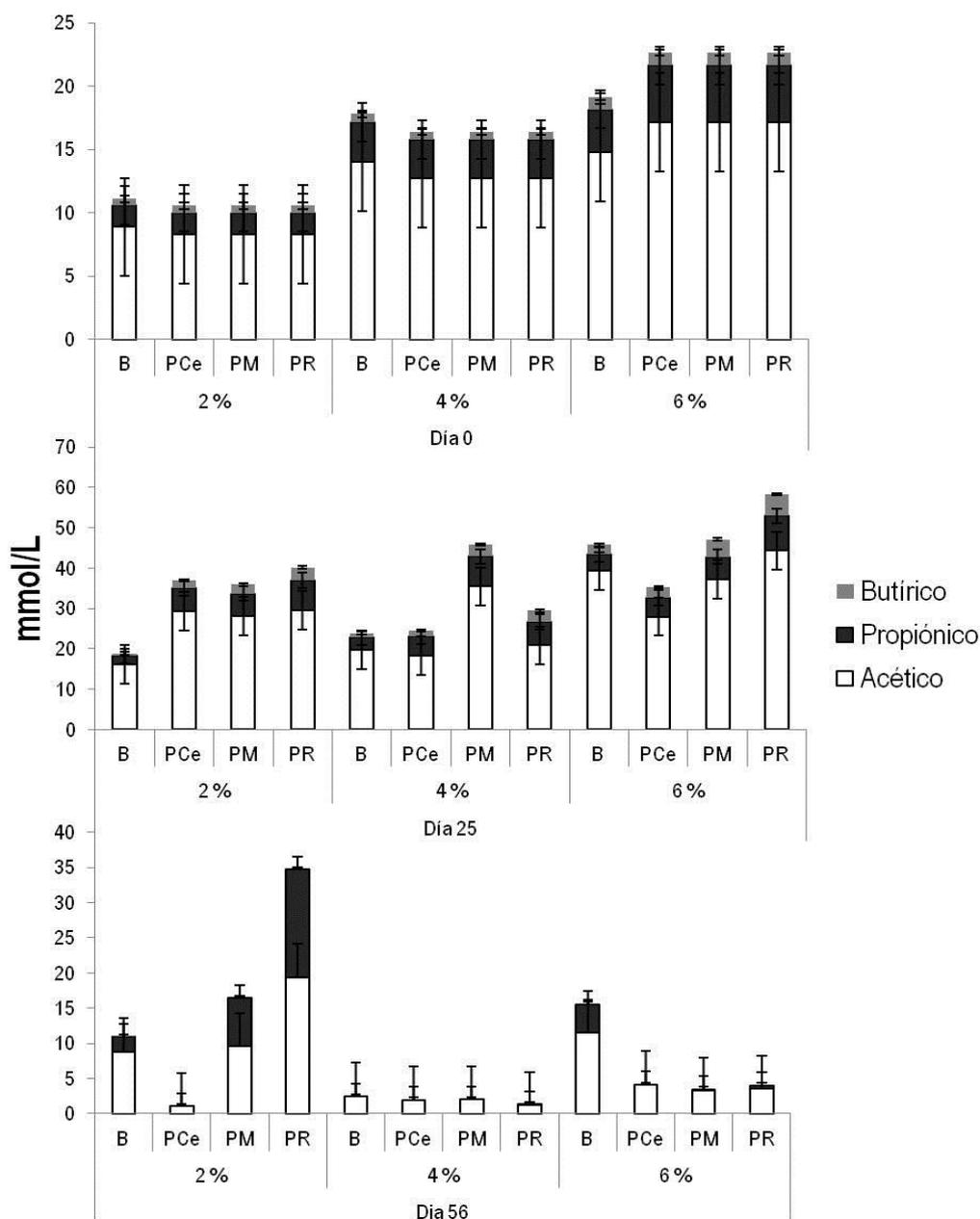


Figura 5.2.5. Concentración (mmol/L) de ácido acético, propiónico y butírico en medios de incubación (botellas), conteniendo inóculo (purín de cerdo al 2, 4 y 6 g MS/100g MF) a diferentes periodos de incubación (0, 25 y 56 días), suplementados con heces bovinas liofilizadas (co-inóculo: 0, 5 y 10 g/100 g MS) y subproductos agrícolas (sustrato: B, Blanco; PCe, Paja de cereal; PM, Pulpa de manzana y PR, Pulpa de remolacha).

Las concentraciones de ácido valérico y la de AGV's de cadena ramificada (BCFA) interaccionaron con ambos, la dilución y el periodo de incubación ($P < 0,01$; Figura 5.2.5). La proporción de valerato alcanzó su valor máximo el día 25 en los purines más concentrados (2,39 y 2,13 mmol/100mmol para los purines con concentraciones del 4 y 6% de MS respectivamente), mientras

que dicho incremento no se observó en el purín más diluido (1,52 mmol/100mmol en el purín con un 2% MS; $P<0,05$). De la misma forma, la proporción de AGV ramificados alcanzó sus niveles máximos a los 25 días de incubación en los purines más concentrados (6,62 y 6,31 para los purines con un 4 y 6% de MS, respectivamente), pero no en el purín más diluido (3,40 para el purín con un 2% MS; $P<0,05$). La concentración de ácido valérico y AGV's ramificados a los 56 días de incubación fue despreciable.

La degradación anaerobia del purín se desarrolla en un proceso continuo, aunque según los diferentes autores (Ostrem, 2004) podemos distinguir diferentes fases específicas, i.e. hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis y finalmente la metanización. En nuestro caso los medios de fermentación fueron muestreados a tiempos discretos (0, 25 y 56 días), por tanto las concentraciones molares de AGV y sus proporciones en el día 0 corresponden a una dilución del purín original, el resto reflejaron las diferentes fases de la fermentación del sustrato.

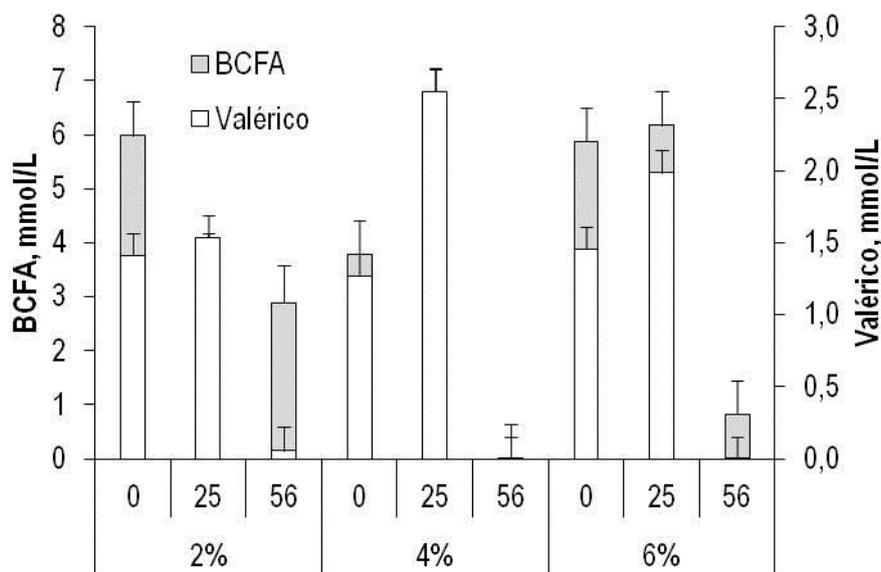


Figura 5.2.6. Concentración (mmol/L) de ácidos grasos de cadena ramificada (BCFA) y ácido valérico en los medios de incubación (botellas), conteniendo inóculo (purín de cerdo al 2, 4 y 6 g MS/100g MF) a diferentes periodo de incubación (0, 25 y 56 días). Interacción: concentración de purín x periodo de incubación.

En el intestino del cerdo adulto el almidón y otros polisacáridos simples o amiláceos son digeridos de forma eficiente, por tanto aquellos que encontramos en las heces pertenecen al grupo de polisacáridos estructurales (celulosas y otros productos fibrosos), cuyo material va a dar lugar una fermentación microbiana que se caracteriza por una elevada producción de ácido acético y ello coincidiría con trabajos previos en los que se han descrito los perfiles de AGV en purín fresco de cerdo

(Møller *et al.*, 2004; Peu *et al.*, 2006). La primera de las réplicas se abrió a los 25 días de incubación y se observó un incremento en la concentración de AGV (mM/L: 12,7 día 0 a 28,8 día 25; $P < 0,01$; Tabla de 5.2.2), dicho incremento reflejaría un estado inicial de la degradación sintrófica caracterizada por la hidrólisis de los diferentes sustratos presentes en el medio y síntesis de los metabolitos intermediarios, los AGV (Jain *et al.*, 1982). Finalmente en la apertura de la segunda réplica (56-días) el proceso sintrófico habría acabado y ello estaría caracterizado con una desaparición (degradación) significativa de propiónico, butírico y del resto de AGV menores, con una prevalencia de ácido acético.

Este proceso está mediado por el grupo de bacterias denominadas como acetogénicas [i.e. *Syntrophomonas wolfei* (sustrato el butirato), *Syntrophobacter wolinii* (sustrato el propionato), *Acetobacterium woodii* y *Clostridium aceticum* (sustratos el H_2 y CO_2)] que transforman los ácidos grasos de cadena corta y otros productos a un único producto de excreción, i.e. ácido acético. Estaríamos claramente en la fase acetogénica del proceso de fermentación sintrófica. Posteriormente las poblaciones acetoclásticas y metanogénicas finalizaran el proceso, con una metanización del sustrato (Ostrem, 2004).

Este proceso, evidenciado por la concentración y el perfil de los AGV del medio fue modificado por el tratamiento experimental. Los niveles de dilución y la adición de pulpa como sustrato potenciador, incrementaron la permanencia de niveles elevados de propionato en el medio en los muestreos a 56-días. La prevalencia del ácido propiónico o el mantenimiento de la fase acidogénica puede estar relacionada con dos factores, un exceso de sustrato que retrasase el proceso de degradación sintrófica (Gerrits y Verstegen, 2006) o un incremento en la síntesis de propionato debido a la presencia de pulpa como sustrato en el medio de fermentación (Canh *et al.*, 1997; Gerrits y Verstegen, 2006), que a su vez incrementaría la población de bacterias sulfato-reductoras (Chen *et al.*, 2008). Este grupo bacteriano podría competir directamente con las poblaciones metanogénicas por el sustrato (Barredo y Evison, 1991).

En relación a los cambios relacionados con el tipo de sustrato, se pudo observar una mayor concentración de acetato y menor de propionato en los blancos y en las botellas suplementadas con P_{Ce} que en aquellas suplementadas con las pulpas, aunque dicho efecto sólo se observó con el purín más diluido.

Una mayor concentración de AGV-ramificados en la apertura de la primera réplica (25-días) se observó en aquellas botellas que contenían los purines más concentrados (4 y 6% MS) y ello coincidiría con el incremento en la concentración de $N-NH_4^+$ derivada de la degradación proteica y del

consiguiendo incremento en la disponibilidad de aminoácidos ramificados, necesaria para la aparición o síntesis de los correspondientes AGV ramificados (Cunningham y Klein, 2007). Sin embargo, el acumulo de AGV ramificados no se mantuvo en la apertura de la segunda replica, a los 56 días, inclusive cuando la concentración de N amoniacal (N-NH₄⁺) se mantuvo prácticamente constante o incluso incrementó.

Tabla 5.2.2. Parámetros químicos en los medios de fermentación (pH, NH₄⁺ y AGV) y su relación con la concentración de purín (2, 4 y 6 g MS/100 ml), tiempo de incubación (0, 25 y 56 días) y sustrato suplementado (600 mg MS/botella: Paja de cereal [PCe], Pulpa de manzana [PM] o Pulpa de remolacha [PR]).

Ítem	Concentración del purín (% MS)				s.e.	Sustrato				s.e.	Días			s.e.
	2	4	6			Blanco	PCe	PM	PR		0	25	56	
pH	7,0	7,2	7,3	0,04	7,3	7,2	7,1	7,1	0,04	7,4	6,9	7,2	0,04	
N-NH ₄ ⁺ , g/L	1,6	2,3	3,4	0,07	2,4	2,4	2,4	2,4	0,08	2,3	2,4	2,6	0,07	
AGV, mM	15,0	12,8	19,8	1,34	15,1	13,9	17,1	17,4	1,55	12,7	28,8	6,1	1,34	
<u>AGV, mol/100 mol</u>														
Acético	63,1	73,8	72,9	2,53	76,9	74,4	67,1	61,3	2,91	64,1	64,6	81,1	2,53	
Propiónico	27,0	16,8	16,4	2,27	14,5	16,0	23,0	26,7	2,61	23,5	19,2	17,6	2,27	
Butírico	4,7	4,7	5,3	0,28	3,8	4,6	5,2	5,9	0,32	5,9	8,8	0,04	0,28	
Valérico	1,0	1,3	1,1	0,09	1,1	1,1	1,2	1,3	0,12	1,4	2,1	0,02	0,09	
BCFA	4,2	3,5	4,3	0,37	3,7	3,9	3,4	4,8	0,44	5,2	5,4	1,2	0,37	

Significación

Ítem	Purín	Sustrato	Día	Purín x Sustrato	Purín x Día	Sustrato x Día
pH	**	**	**	ns	*	**
N-NH ₄ ⁺ , g/L	**	ns	*	**	**	ns
AGV, mM	**	ns	**	ns	**	ns
<u>AGV, mol/100 mol</u>						
Acético	**	**	**	*	**	ns
Propiónico	**	**	ns	*	**	*
Butírico	ns	**	**	ns	**	**
Valérico	ns	ns	**	ns	**	ns
BCFA	ns	ns	**	ns	**	ns

ns=P>0,05, *=P<0,05, **=P<0,01

En relación al efecto del co-inóculo, la adición a las botellas de diferentes niveles de heces liofilizadas frescas de vacuno (0, 5 y 10% sobre la MS) modificó ligeramente los perfiles molares de los AGV, incrementando la proporción molar de propiónico (17,53, 18,42 y 24,94 mmol/100mmol, respectivamente) en detrimento de las de acético ($P<0,06$) y siendo este efecto más acusado con el nivel más alto de inclusión.

Es importante señalar que la interacción entre periodo (días) de incubación y la concentración de AGV ($P<0,05$), y la relación diferencial acético/propiónico en dichas muestras indican que la evolución en el proceso de fermentación sintrófica no fue simultáneo y en algunos casos, dependiendo de la dilución del purín y el tipo de sustrato utilizado, la co-digestión (metanización) del sustrato no fue completa y en la Tabla 5.2.3 se presenta la evidencia de dicho proceso.

Tabla 5.2.3. Concentración media de ácidos grasos volátiles (AGV) y proporción relativa (mmol/100mmol) de acético en las botellas donde se incubaron los diferentes sustratos (blanco, paja de cereal y las pulpas de manzana y remolacha) al final del periodo de incubación (56 días, T56). Interacción; tipo de sustrato x concentración de purín.

AGV (mmol/L)					Acético (mmol/100mmol)			
[c] del purín % MS	2	4	6	s.e.	2	4	6	s.e.
Sustratos								
Blanco	8,81 ^y	2,46	11,49	2,11	89,55 ^x	100,0	79,37	4,72
Paja cebada	5,89(4,23) ^y	2,85	11,91		92,20(9,44) ^x	100,0	84,15	
P. manzana	17,09 ^{axy}	2,87 ^b	11,05 ^b	2,99	15,70 ^{by}	100,0 ^a	77,22 ^a	6,68
P. remolacha	26,94 ^{ax}	2,04 ^b	11,29 ^b		5,38 ^{by}	91,5 ^a	72,86 ^a	

Los superíndices (^{a, b}), indican diferencias significativas ($P<0,05$) entre concentraciones de purín (MS) y (^{x, y}), diferencias significativas entre sustratos. Entre paréntesis () los s.e. correspondiente a los tratamientos donde se observaron datos faltantes.

Atendiendo al proceso de degradación sintrófica, la presencia de MO básicamente en forma de ácido acético, formas no acéticas o elevadas concentraciones de AGV son indicadores de que el proceso de metanización no ha concluido. En la Tabla 5.2.3 se aprecia claramente como el proceso de metanización fue incompleto en algunos tratamientos, claramente el exceso de MO en el purín inicial, debido bien a una concentración excesiva de purín o bien por la adición de fuentes de hidratos de carbono no estructurales como la paja de cereales o las pulpas retardaron el proceso y no se alcanzó la metanización total del sustrato, que fue el objetivo primordial de este ensayo. Por tanto, ambos factores no pudieron corregir las hipotéticas deficiencias del sistema de fermentación y consecuentemente no funcionaron como elementos activadores o potenciadores de los ritmos de fermentación del purín de cerdo.

Contrariamente una dilución excesiva del purín (< 4%) parece ejercer también un efecto depresivo sobre el proceso de fermentación, ya sea por un exceso de dilución o la deficiencia de algún nutriente que no pudo ser corregida por el tratamiento experimental impuesto.

Llegado a este punto y detectada la incompleta digestión del sustrato, los estudios que se detallarán a continuación en lo que se refiere al i) estudio de la población metanogénica que interviene en el proceso y ii) modelización de la respuesta en la producción de biogás i/o metano para estimar su producción potencial a tiempos cortos de incubación. Ambos estudios se han desarrollado sólo a partir del purín con una concentración de MS intermedia (i.e. 4%).

5.2.5. Evolución de las poblaciones bacterianas en el sistema de fermentación.

5.2.5.1. Evolución de los títulos bacterianos: Bacterias totales (BT).

La evolución de la población de bacterias totales (BT) difirió dependiendo de la concentración de MS en el purín ($P < 0,005$), así los purines más diluidos (2% MS) mostraron una menor población de BT (Figura 5.2.7; día 0 y 25) en relación a los purines más concentrados (4 y 6%, respectivamente) ($P < 0,001$). Al final del período de incubación la población (56 d) de BT difirió también entre los purines con las mayores concentraciones de MS, así, el número de copias del gen 16S rARN fue superior en el purín con un 6% MS que en el purín con 4% MS (log 6,59 s.e. 0,64 vs 4,00 s.e. 0,59). El uso de sustratos (PCe, PM y PR) en ningún caso alteró la población de BT y AM, ni sus proporciones relativas ($P > 0,05$).

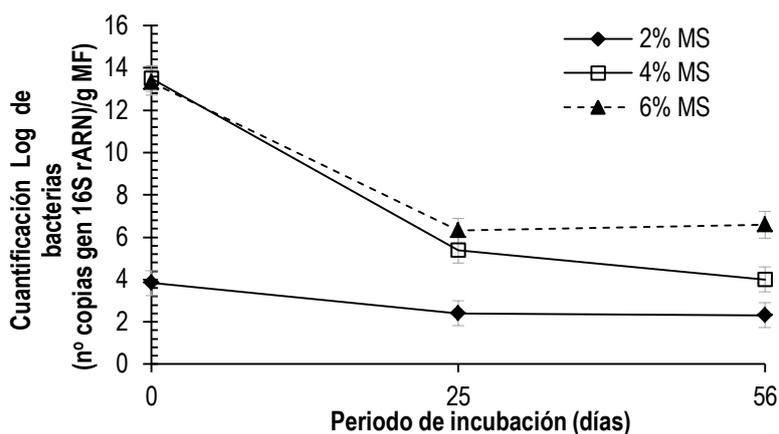


Figura 5.2.7. Cuantificación absoluta (nº de copias/g MF) del gen 16 S rARN (BT) en las botellas que contenían las diferentes concentraciones de purín durante el proceso de incubación.

La adición de arqueas exógenas como inóculo secundario (co-inóculo), no modificó los títulos de BT en los purines más diluidos (2% MS; $P > 0,05$). Sin embargo, su adición a los purines más

concentrados dio lugar a una respuesta diferencial (Figura 5.2.7). En el primer caso (4% MS) los títulos de BT disminuyeron con el nivel de inclusión, i.e. 10%, mientras que en el segundo (6% MS) se apreció el efecto contrario, incrementando las poblaciones totales con un nivel mayor de inclusión de co-inóculo (Interacción significativa entre la concentración de MS del purín y la dosis de co-inóculo en el medio; $P < 0,01$).

En la Figura 5.2.7 se muestran gráficamente las concentraciones de bacterias totales (BT), considerado que cada nivel de purín se formuló a partir de una cantidad proporcional de heces, ello debería estar reflejado en una concentración creciente de bacterias y ello no fue así, los niveles de 4 y 6% de MS mostraron las mismas concentraciones. Las razones que justifican estos resultados podrían estar relacionadas: i) con una falta de precisión en la qPCR por saturación del sustrato (durante la ampliación o incorporación del cromóforo) ó ii) por la presencia de sustancias que interferirían en el proceso de amplificación. Dado que las heces se liofilizaron y molieron, resulta difícil justificar dichos valores por una falta de homogeneidad del sustrato inicial.

Con el período de incubación la concentración de los títulos de BT decrecieron y ello fue más evidente en los medios más concentrados. Sólo una fracción de las poblaciones bacterianas fue capaz de adaptarse al nuevo ecosistema (i.e. medio de cultivo, producción / acumulación de AGV, presión de H_2 , toxicidad, etc.). Las diferencias registradas entre los días 25 y 56 indicarían que tras la fase inicial de adaptación, el sistema se equilibró.

De los distintos sustratos analizados ninguno alteró la población de BT o AM, ni sus proporciones relativas. Por ello, las diferencias existentes deben ser referidas a parámetros relacionados con la concentración del purín. La adición de co-inóculo no alteró los títulos bacterianos en el purín diluido (2% MS), mostrando en los purines más concentrados una evolución irregular.

5.2.5.2. Arqueas metanogénicas hidrogenotróficas.

Tal como se describió en el capítulo anterior el proceso de metanización no se completó ni en los purines más concentrados ni en los más diluidos, por ello en la Tabla 5.2.4 se presenta el perfil y la evolución de las BT y arqueas sólo en el purín cuya concentración permitió una metanización total del sustrato (i.e. 4% MS).

La adición de diferentes tipos de sustratos no alteró la concentración de BT en las botellas, sin embargo, con el periodo de incubación sus títulos decrecieron y lo hicieron de forma significativa (de 15,1 a 3,1 log copias del gen 16S-rARN/g MF; Tabla 5.2.3). La adición de cantidades crecientes de co-

inóculo interactuó con el periodo de incubación, así al adicionar un 5% de co-inóculo las BT decrecieron significativamente del día 0 al 25 (14,8 vs 4,9; $P < 0,05$) para permanecer sus títulos posteriormente constantes (3,9: día 56, $P > 0,05$), mientras que la adición del 10% de co-inóculo mostró un comportamiento inicial similar (9,4 vs 5,1; $P < 0,05$), pero posteriormente (56 d) la concentración disminuyó (3,4; $P < 0,05$). La concentración relativa de arqueas también disminuyó con el periodo de incubación ($P < 0,01$), independientemente del tipo de sustrato o nivel de co-inóculo utilizado.

Contrariamente al patrón observado en las arqueas totales las poblaciones de AMH mostraron un incremento en su abundancia relativa de 0 a 25 días de incubación, para después reducir sus títulos entre el día 25 al 56 de incubación. De igual manera su concentración se incrementó y lo hizo proporcionalmente con la presencia de co-inóculo en el medio (Tabla 5.2.4; $P < 0,05$). Además la proporción de AMH se redujo en aquellas botellas suplementadas con paja de cereal.

Las bacterias metanógenas son sensibles a los cambios en su nicho, su hábitat se limita a condiciones estrictas siempre que existan sustratos disponibles, aunque estos puedan ser limitados (Kaspar y Wuhrmann, 1978). Así las condiciones físico-químicas, composición de la comunidad bacteriana y la disponibilidad de materia orgánica son los factores ambientales que determinan la supervivencia de las poblaciones metanógenas en los ecosistemas naturales (i.e. pantanos, sedimentos de río y sedimentos de lagos, Calli *et al.*, 2005). En purines frescos se han descrito diversas comunidades de arqueas (Dabert *et al.*, 2008), compuestas por microorganismos hidrogenotróficos y metilotróficos capaces de adaptarse a las condiciones impuestas por un sistema de fermentación "*in vitro*". En estas condiciones, se ha descrito la concentración de amoníaco (Massé *et al.*, 2003) y el exceso de carga orgánica (González-Fernández y García-Encina, 2009) como los factores limitantes más comunes. Posiblemente estas causas podrían justificar la incompleta degradación de los purines con concentraciones de MS extremas.

Si bien es cierto que las condiciones impuestas por el sistema "*in vitro*" son más uniformes que en los ecosistemas naturales (Angenent *et al.*, 2002), la maduración "*in vitro*" del purín redujo la biomasa, tanto a lo que se refiere a bacterias totales como en las arqueas. Efectivamente, con la incubación del sustrato los títulos de arqueas totales se redujeron, sin embargo, las AMH incrementaron inicialmente para después decrecer. En este sentido Dabert *et al.* (2008) sugiere que dichos cambios deberían ser relacionados con una capacidad diferencial de las poblaciones metanogénicas para adaptarse a los diferentes medios.

Tabla 5.2.4. Efecto del tipo de sustrato suplementado (600 mg MS/botella; paja de cereal (PCe), pulpa de manzana (PM) o pulpa de remolacha (PR)), tiempo de incubación (0, 25 y 56 días) y nivel de co-inóculo (al 0, 5 ó 10% de MS/botella) en producción de metano (ml), abundancia de bacterias totales en el medio (gen molecular 16S-rARN/g MF), arqueas totales [% de bacterias totales; $\Delta C(t)$] y metanógeno hidrogenotróficas [% de arqueas totales; $\Delta C(t)$] en purín al 4% MS.

Ítem	Sustrato				s.e.	Días			s.e.	Co-inóculo			s.e.
	Blanco	PCe	PM	PR		0	25	56		0%	5%	10%	
Producción de CH ₄ (ml)	48,8	53,8	47,2	48,7	4,55	0	46,5	102,4	4,75	32,6	55,9	60,4	4,33
Bacterias totales	7,8	7,7	7,5	7,4	0,36	15,1	4,7	3,1	0,38	9,0	7,9	6,0	0,56
Arqueas totales	0,4	0,3	0,3	0,3	0,05	0,5	0,3	0,1	0,05	0,2	0,4	0,4	0,43
Metanógeno hidrogenotróficas	0,5	0,1	0,6	0,3	0,16	0,1	0,6	0,3	0,17	0,0	0,3	0,7	0,16
Biodiversidad de Arqueas totales													
Riqueza	25,3	25,5	24,2	25,0	0,50	22,7	26,5	25,8	0,53	24,7	24,3	26,0	0,48
Índice Shannon	3,2	3,2	3,2	3,2	0,02	3,1	3,3	3,3	0,02	3,2	3,2	3,2	0,02
Uniformidad	0,8	0,8	0,8	0,8	0,005	0,8	0,8	0,8	0,005	0,8	0,8	0,8	0,004

Significación

Ítem	Sustrato	Día	Co-inóculo	Co-inóculo x Día	Sustrato x Día
Producción de CH ₄	ns	***	*	ns	ns
Bacterias totales	ns	**	**	**	ns
Arqueas totales	ns	**	ns	ns	ns
Metanógeno hidrogenotróficas	*	ns	*	ns	ns
Biodiversidad de Arqueas totales					
Riqueza	ns	**	**	**	ns
Índice Shannon	ns	**	*	**	ns
Uniformidad	ns	***	*	**	ns

ns= $P>0,05$; *= $P<0,05$; **= $P<0,01$; ***= $P<0,001$

El adicionar heces de vaca liofilizadas a las botellas incrementó los títulos de arqueas totales y AMH, y la biodiversidad de las AMH. La predominancia de AMH en el sistema digestivo de rumiantes (Kim *et al.*, 2011) podría explicar la mejora en los títulos de la población de AMH en la incubación y su lenta capacidad de adaptación a un nuevo “*in vitro*” ambiente (Snell-Castro *et al.*, 2005). La mejora en los títulos de AMH no mejoró la producción total de metano, pero incrementó su eficiencia de producción.

5.2.5.3. Estructura de la población de AHM: Biodiversidad.

La estructura de la población de las arqueas en la muestras de purines que se analizaron por Electroforesis en Gel de Gradiente Desnaturalizante “DGGE” (Figura 5.2.8). La ampliación del ADN a partir de cebadores específicos para arqueas (Apartado Material y Métodos: Tabla 4.8) generó 38 bandas, 25 en las heces originales (Tiempo 0 = B0).

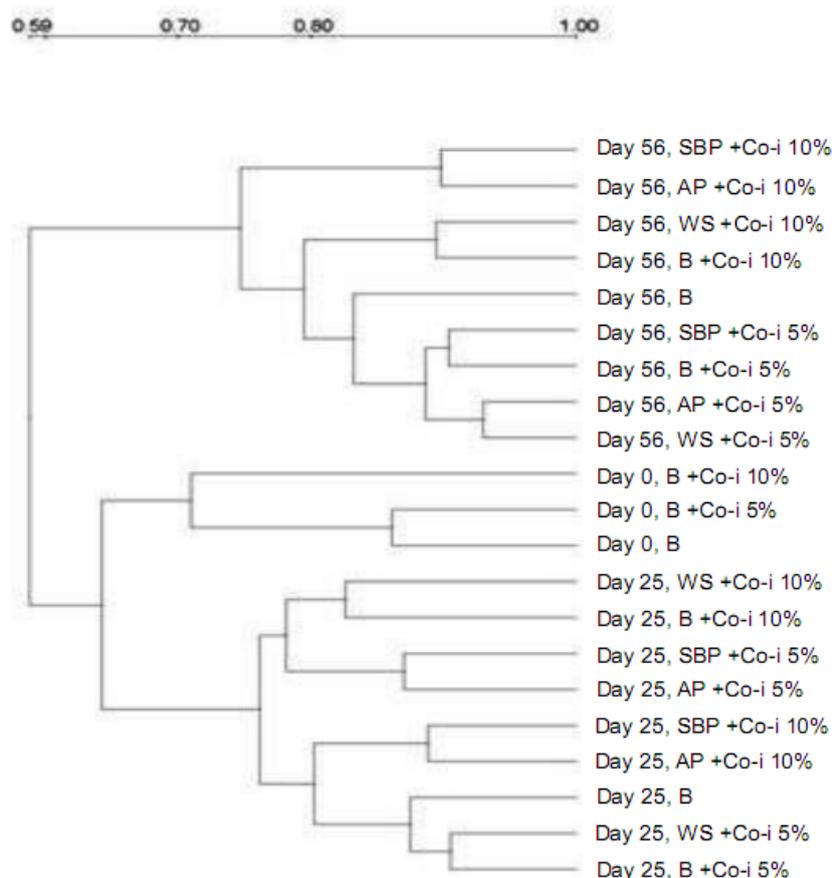


Figura 5.2.8. Dendrograma correspondientes a las bandas obtenidas por DGGE, representan el efecto del tiempo de incubación (0, 25 y 56 días), la adición del co-inóculo (0, 5 y 10% de heces frescas de vaca liofilizadas) y sustrato (B, Blanco; WS: paja de cereal; AP: pulpa de manzana y SBP: pulpa de remolacha) sobre la estructura poblacional de arqueas. La escala de la figura muestra la proporción de similitud.

En general, las heces compartieron un nivel de similitud del 59% y un claro patrón de agrupación, las muestras obtenidas el día 56 formaron un clado independiente de aquellas obtenidas del día 0 y 25. Y dentro del mismo clado las muestras del purín original se diferenciaron de aquellas obtenidas el día 25. Además, a lo largo del periodo de incubación la suplementación con diferentes niveles de co-inóculo se reflejó en la estructura de la población. Las muestras suplementadas con el 5 o 10% de co-inóculo se agruparon independientemente, y en el caso del nivel más alto de suplementación el número de bandas incrementó y lo hizo de forma significativa ($P < 0,05$), lo que incrementó los índices de biodiversidad. La adición del co-inóculo incremento el número de bandas (fundamentalmente en nivel Co-inóculo 10%), aunque dichas diferencias entre bandas fueron más pronunciadas a los 25 días (25, 25,5 y 29,5 bandas) que a los 56 días de incubación [25, 25,5 y 27,5 bandas correspondientes a niveles de inclusión de co-inóculo del 0, 5 y 10% de MS, respectivamente; Interacción periodo de incubación x nivel de co-inóculo: $P < 0,05$]. El índice Shanon y los índices de uniformidad mostraron un patrón similar al mostrado por el número de bandas.

5.2.6. Producción de CH₄: “metanización” total del sustrato y modelos de respuesta.

Para determinar la producción potencial de CH₄ del purín se procedió a su digestión o “metanización” durante 56 días. Para ello se partió del protocolo “*in vitro*” propuesto por Theodorou *et al.* (1994) y que, tal como hemos revisado en capítulos anteriores, se basa en un ensayo discontinuo, utilizando pequeñas cantidades de sustrato en un medio donde podemos obtener una biodegradación vía anaerobia de sustrato orgánico, optimizando las condiciones para obtener la máxima producción de CH₄.

El sistema propuesto nos permitió analizar e identificar la evolución, con el tiempo, de la producción de CH₄ hasta un periodo de 56 días en los que se procedió a suspender la incubación basándonos en las mediciones de producción de gas (Ap. M & M). Si bien es cierto que en los niveles de producción de gas se alcanzó una situación de “Plateau”, este hecho no fue tan evidente cuando los valores de concentración de CH₄ se analizaron y procesaron (ver figura 5.2.1 y 5.2.2 del presente capítulo).

En el presente apartado se pretendió confirmar que se habían alcanzado los niveles máximos de producción o en su caso estimarlos, para ello diversos modelos cinéticos se ajustaron a la curva de producción de CH₄. Se analizaron diferentes modelos cinéticos, pero finalmente el que mostró una mayor precisión, o mayor capacidad de ajuste a los resultados obtenidos fue el modelo de comportamiento cinético de Gompertz, basado en una evolución de doble exponencial, previamente

utilizado en producciones de gas y CH₄ en incubaciones de purines de cerdo Flotats *et al.* (2001) y cuya descripción y modelo cinético se presenta en el apartado 4.3.2 de M & M.

El ajuste del modelo Gompertz nos permitió determinar la producción acumulada (B_0 : ml/gMO) y el proceso de ajuste se realizó únicamente con el purín que había mostrado los mayores índices de “metanización” (i.e. 4% MS). Este modelo además de calcular los niveles máximos de producción (B_0) considera la presencia de un tiempo de retraso o desfase inicial, previo al inicio de la síntesis de CH₄ (λ) así como un ritmo fraccional de producción (R). Los parámetros estimados se presentan en la tabla 5.2.5, junto con los valores reales de producción acumulada de CH₄ registrados el día 56 de incubación del sustrato.

En dicha tabla se analiza también el efecto de la inclusión de diferentes sustratos (i.e. paja de cereales, PCe; pulpa de manzana, PM, o remolacha PR sobre los medios sin suplementar o blancos) o co-inóculos (inclusión sobre el purín sin suplementar, un 0%, 5% y 10% sobre MS de heces de vaca como fuente de arqueas exógenas).

Efectivamente, los niveles de producción potencial o máxima (B_0) estimadas a partir del modelo de Gompertz fueron algo superiores a los valores de producción acumulada de CH₄ tras 56 días de incubación del sustrato. Ello implicaría que, en dicho periodo aún no se habrían alcanzado los niveles máximos de producción de CH₄ y por tanto no se habría obtenido la metanización completa del sustrato. No obstante, es necesario señalar que las diferencias no fueron homogéneas entre tratamientos. Las diferencia entre las producciones acumuladas de metano a los 56 días y las estimadas con el modelo de Gompertz fueron máximas en el caso de la paja de cereales y pulpa de remolachas (\approx 80%), pero mínimas en el caso del purín sin suplementar (\approx 90-95%) donde prácticamente se habrían alcanzado los niveles máximos de producción de CH₄.

Por tanto, las producciones acumuladas de CH₄ a 56 días post-incubación serían una medida válida de la “metanización” total del sustrato y el modelo de Gompertz reflejaría de forma consistente la evolución en el tiempo de la producción de CH₄ siempre trabajando en purines de cerdo sin suplementar con niveles de concentración de MS próximos al 4%.

En ningún caso se apreció un efecto significativo del tipo de sustrato o co-inóculo sobre la producción máxima o potencial de CH₄ (B_0). Sólo en el caso de la pulpa de remolacha se observó un menor ($P<0,05$) ritmo de producción (R), menor a los registrados con los blancos o los medios

suplementados con paja de cereales, pero que no difirieron de los registrados en los medios suplementados con pulpa de manzana.

Probablemente en los medios de cultivo suplementados con pulpa de remolacha se registró un menor ritmo de producción (R) y una menor producción aparente de CH₄, y ello, en capítulos anteriores se pudo asociar con una acumulación de AGV y acidificación del medio debido a los rápidos procesos de degradación inicial de un sustrato fácilmente degradable como lo son los carbohidratos estructurales que constituyen la pulpa de remolacha.

No se observaron diferencia significativas en relación a la adición de fuentes exógenas de arqueas metanogénicas (co-inóculo).

Tabla 5.2.5. Valores medios de producción acumulada de metano a 56 días post-incubación junto con los parámetros obtenidos mediante el ajuste del modelo Gompertz a los valores de producción de CH₄ registrados en el purín con una concentración de MS del 4% suplementando los medios de cultivo con diferentes tipos de carbohidratos (Blanco; Paja de cereal, PCe; Pulpas de manzana, PM y de remolacha, PR) e inoculado arqueas exógenas (heces frescas de vaca: 0, 5 y 10% de la MS del inóculo).

Ítem	mL CH ₄ /gMO	Parámetros del modelo Gompertz		
		B ₀ (ml CH ₄ /gMO)	R (ml CH ₄ /gMO / día)	λ (días)
Blanco	151,4(14,94)	167,7(24,27)	5,87(0,574) ^a	18,90(12,596)
PCe	147,1(24,37)	182,9(38,03)	5,75(0,792) ^a	22,44(25,473)
PM	152,4(29,37)	170,2(46,29)	4,95(0,832) ^{ab}	18,57(35,645)
PR	88,6(31,64)	102,0(52,14)	2,44(0,888) ^b	-41,08(41,056)
Co-inóculo 0%	121,6(34,45)	135,1(57,61)	5,10(1,239)	9,72(36,261)
Co-inóculo 5%	146,6(17,57)	181,9(28,35)	4,74(0,513)	9,32(21,555)
Co-inóculo 10%	136,6(21,05)	150,0(32,09)	4,42(0,489)	-4,90(27,401)

(Error estándar)

^{ab} valores en la misma columna con superíndices distintos son diferentes ($P < 0,05$).

5.3. Emisión de NH₃ y GEI en cerdos: Fase de transición.

En este estudio se pretende evaluar la emisión de NH₃ y GEI para cerdos en el periodo de transición que se establece desde el destete (8,5 kg PV) y el inicio del cebo (\approx 20 - 25 kg PV), en condiciones comerciales de explotación.

5.3.1. Condiciones ambientales.

La prueba tuvo una duración de 6 semanas (Febrero-Marzo, 2013), durante este periodo la temperatura media fue de 26,9 *d.e.* 2,19 °C y la humedad relativa 61,6 *d.e.* 15,4%. Las condiciones ambientales registradas durante el periodo de muestreo del gas se presentan en la Tabla 5.3.1, tanto a lo que se refiere a los módulos estancos (ME = 2) como a las fosas de deyecciones.

Tabla 5.3.1. Condiciones ambientales registradas durante el periodo del muestreo de gases en los módulos estanco (temperatura, humedad relativa y flujo de renovación) y en la fosa de deyecciones [(temperatura (°C), pH, altura del purín (cm) y renovación del aire (L/m²/h)].

Procedencia	Ítem	Módulo	<i>d.e.</i>
Módulo	Temperatura °C	27,2	1,08
	Flujo de renovación de aire, m ³ /h	262,1	12,60
	Humedad relativa, %	80,1	6,26
Fosa	Temperatura °C	20,8	0,92
	Flujo de renovación de aire, l/m ² /h	35,3	0,30
	pH	6,9	0,19
	Altura del purín inicial, cm	31	6,36
	Altura del purín final, cm	38	9,19

Durante el periodo experimental los módulos, de temperatura controlada, registraron una temperatura media de 27,2 *d.e.* 1,08 °C, una humedad relativa de 80,1 *d.e.* 6,26% y un flujo medio de renovación de aire de 262,3 y 265,9 m³/h para M1 y M2, respectivamente. Lo que corresponde a 6,56 y 6,65 m³/h/cerdo. Citar que las condiciones en el ambiente de los módulos de transición se situarían en el rango de normalidad dentro de las recomendaciones de la European Commission (2003) y los descritos por Latorre y Miana (2008).

Las condiciones en fosa de deyecciones al momento del muestreo de NH₃ y GEI se presentan también en la Tabla 5.3.1. Los valores registrados mostraron variaciones de relevancia mínima, no obstante, los niveles (altura) de purín del estudio fueron elevados, más elevados que los niveles utilizados durante las pruebas de cebo. La complejidad del sistema de vaciado, hizo que las

deyecciones se mantuvieran almacenadas durante las 6 semanas de la prueba, ello no coincide con el protocolo seguido en posteriores ensayos, pero sí con el procedimiento convencionalmente utilizado en granjas comerciales durante la fase de transición.

5.3.2. Parámetros productivos.

El ritmo medio de crecimiento o GMD se muestra en Tabla 5.3.2. No se registraron diferencias en los pesos iniciales y finales de ambos módulos, y sus valores medios fueron de 8,58 y 25,46 s.e. 0,38 kg, respectivamente. Los ritmos de ganancia media (GMD: g/día) e ingestión de MF (IMF: g/día) incrementaron con el desarrollo de los animales (Tabla 5.3.2), sin que se apreciaran diferencias significativas entre módulos para la GMD (400 y 408 s.e. 10 g/día en M1 y M2, respectivamente), no obstante, los registros del consumo de alimento (IMF), fueron ligeramente superiores en el M1 que en M2 (680 vs 724 s.e. 7 g/día, para M1 y M2, respectivamente; $P < 0,05$). El índice de conversión (IC) fue independiente de la edad de los animales y del alojamiento.

Comparando los resultados relativos a ingestión, GMD y su tasa (IC), nuestros resultados estarían dentro del rango propuestos en bibliografía (Tabla 5.3.4) para condiciones experimentales/ambientales similares, 742 - 859 g para los niveles de ingestión de MF (Cabaraux *et al.*, 2009; Hermes *et al.*, 2009 y Nicks *et al.*, 2003), o de 377 - 397 g/d para la GMD (Cabaraux *et al.*, 2009; Fernández *et al.*, 1999; Nicks *et al.*, 2003).

Tabla 5.3.2. Parámetros productivos [Pesos vivo (PV), Ganancia media (GMD), Ingestión media de materia fresca (IMF \approx 88% MS) y Índice de conversión (IC = IMF/GMD) registrados en cerdos en fase de transición.

Ítems	Semanas de vida				s.e.	P-valor	
	Inicio (4)	6	8	Final (10)		Semana	Módulo
Peso, kg	8,58 ^d	12,35 ^c	17,77 ^b	25,46 ^a	0,38	<,0001	0,6511
IMF, g/día		427 ^c	643 ^b	1.037 ^a	8,8	<,0001	<,0001
GMD, g/día		278 ^c	387 ^b	553 ^a	13,0	<,0001	0,4798
IC, kg/kg		1,78	1,84	1,96	0,08	0,2895	0,4512

^{abcd} valores en la misma fila con superíndices distintos son diferentes ($P < 0,05$).

5.3.3. Concentraciones de NH₃ y GEI registradas en los módulos de transición.

Bajo las condiciones citadas previamente, en Figuras 5.3.1 (a, b), 5.3.2 y 5.3.3 (a, b) se muestra la evolución circadiana de la concentración de compuestos nitrogenados (i.e. NH₃ y N₂O) y CH₄, las variaciones en la temperatura y humedad relativa registradas no parecen ejercer un efecto claro sobre

las concentraciones de gas en los módulos. La concentración media (mg/m^3) de gases en aire evacuado de los módulos estancos y de la fosa de deyecciones, respectivamente, fue 2,6 y 27,14 para el NH_3 ; 0,27 y 0 para el N_2O ; y 19,73 y 4.290 para el CH_4 .

En relación a las concentraciones registradas *en el módulo de transición* (Figura 5.3.1), se observó un patrón similar para ambos gases nitrogenados (NH_3 y N_2O), cuya concentración se mantuvo relativamente constante a lo largo del día. En el caso del metano, si se apreció una tendencia a incrementar en las últimas horas del día. No obstante, dicho incremento fue aparente y en ningún caso alcanzó significación estadística ($P > 0,05$) (Figura 5.3.2). Los cambios en concentración circadiana pueden estar asociados con diversos factores: la actividad del animal (Jørgensen *et al.*, 2011), los periodos de excreción de heces-gases que tienden a situarse durante el día (Osada *et al.*, 1998), la temperatura (Blanes-Vidal *et al.*, 2008) y tipo /suministro del alimento (Dong *et al.*, 2007). En este punto cabe señalar que durante el periodo de transición a diferencia del experimento de cebo la emisión de NH_3 y GEI se controló durante horas nocturnas, horas en las cuales se registró la menor concentración de CH_4 (3 am: 9 pm – 9 am).

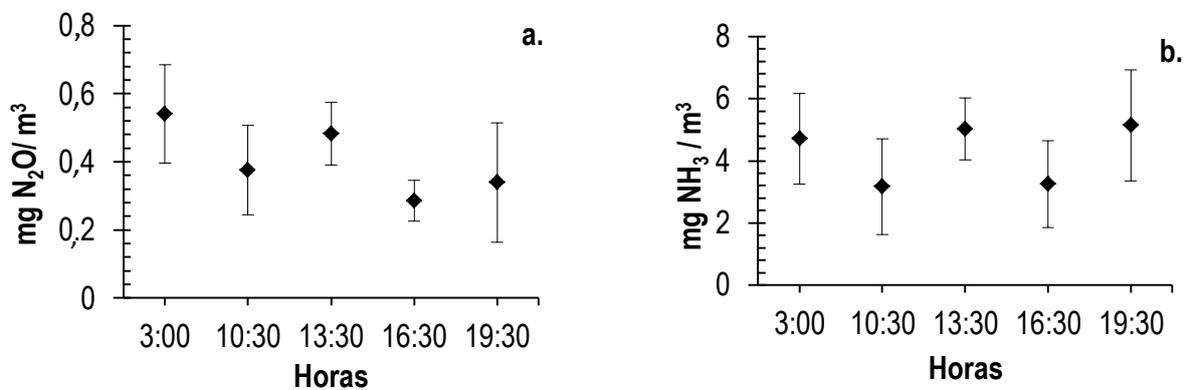


Figura 5.3.1. Evolución circadiana para la emisión de N_2O (a) y NH_3 (b) en los módulos de transición.

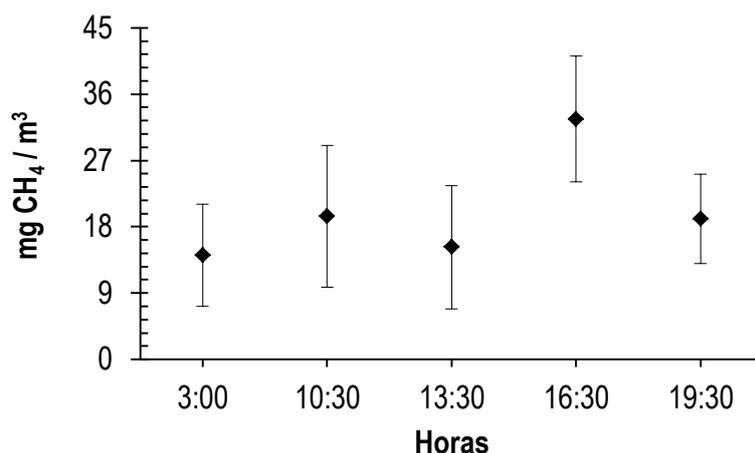


Figura 5.3.2. Evolución circadiana para la emisión de CH₄ para el módulo de transición.

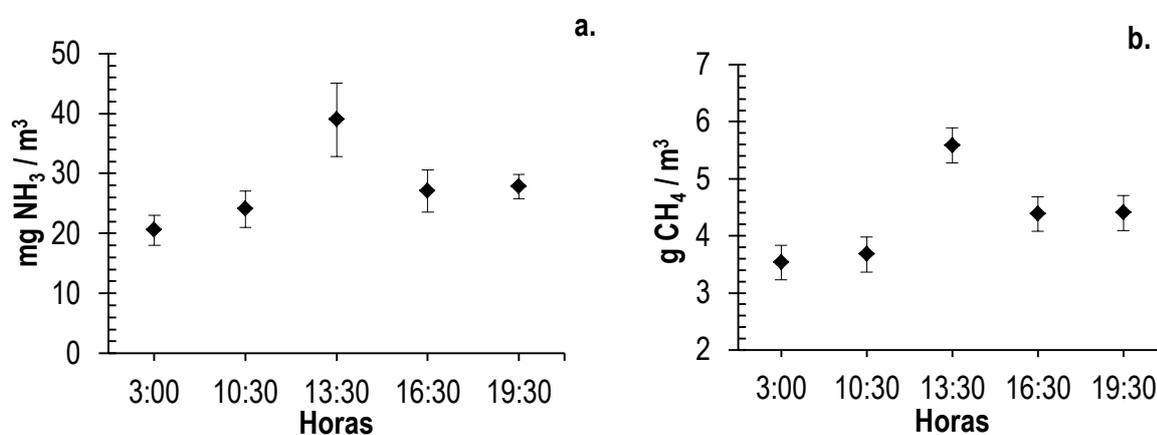


Figura 5.3.3. Evolución circadiana para la emisión de NH₃ (a) y CH₄ (b) del aire evacuado de las fosas de deyecciones.

5.3.4. Emisiones registradas de NH₃ y GEI (CH₄ y N₂O) en cerdos en transición.

En las condiciones ambientales (Tabla 5.3.1) descritas para los módulos de transición estancos y en la fosa de deyecciones; en la Tabla 5.3.3 se muestran los valores de emisión gaseosa observadas en los animales durante fase de transición (80 lechones, PV: 22,54 s.e. 0,52 kg PV), alojados en dos módulos contiguos, con piso emparrillado plástico y fosa independiente en cada módulo. La emisión media absoluta de NH₃ (que incluye la procedente del animal y sus deyecciones) no difirió entre módulos y su valor medio se situó en 0,42 g an/día (s.e. 0,03) o 40,76 mg/kg PV^{0,75} (s.e. 2,87) cuando la emisión diaria se expresó de forma individual o corregida para el peso metabólico (medio). La emisión de NH₃ procede de la urea degradada a amoníaco por la actividad ureásica cuyo origen es microbiano (Aarnink y Verstegen, 2007; Canh *et al.*, 1998b; van der Peet-Schwering *et al.*, 1999). La

emisión procedente de la fosa tuvo una mínima relevancia (1,7% del total emitido) y se situó en 7,1 mg an/día (s.e. 0,7) o 0,7 mg/kg PV^{0,75} (s.e. 0,07).

Los niveles de emisión de NH₃ (g an/día) se sitúan en el rango propuesto por la European Commission (2003) [0,16 a 2,2] y los valores descritos por Montalvo *et al.* (2013) [0,18 a 0,46], aunque son ligeramente superiores a los valores propuestos por Cabaraux *et al.* (2009) [0,31 y 0,36], cuyas condiciones de explotación fueron similares. Dichos autores citan que el tipo de emparrillado (plástico vs hormigón) y las propias condiciones de almacenamiento de las deyecciones pueden explicar las diferencias en los resultados registrados. Es necesario señalar que la emisión de NH₃ procedente de la fosa fue irrelevante, y no hemos podido encontrar estudios que separen la fracción de NH₃ procedente de las deyecciones y que valide nuestros resultados en animales en transición.

Los niveles de emisión de NH₃ en lechones en transición fueron siempre inferiores a los valores registrados en la fase de cebo, en valores individuales (Cap. 5.4.2.2: 1,19 a 10,44 g an/día) o cuando se corrigieron por el peso metabólico (Cap. 4.4.2.2: 89,5 a 325,4 mg/kg PV^{0,75}). En relación a los niveles de emisión procedente del almacenamiento de las deyecciones se observó el mismo comportamiento.

Tabla 5.3.3. Emisión de NH₃ y GEI (CH₄ y N₂O) en cerdos en transición (PV = 22,54 s.e. 0,52 kg) recibiendo una ración comercial (PB: 16,7%; FND: 9,9%). Los niveles de emisión corresponden a la emisión total (Módulos) y la procedente del almacenamiento de las deyecciones (CFC, Fosas).

Gas	Módulos		s.e.		Fosa		s.e.	
	g/día	mgkgPV ^{0,75}	g/día	mgkgPV ^{0,75}	g/día	mgkgPV ^{0,75}	g/día	mgkgPV ^{0,75}
NH ₃	0,42	40,76	0,03	2,87	0,0071	0,69	0,0007	0,067
CH ₄	3,20	310,02	0,15	12,87	1,12	108,79	0,14	13,42
N ₂ O	0,043	4,17	0,003	0,33	-	-	-	-

El CH₄ se origina a partir de los procesos de fermentación microbiana en el tracto ceco-colónico, dichos procesos tiene su continuación en la fosa de deyecciones, y por ello existe y se ha descrito un importante componente fecal (Blanes-Vidal *et al.*, 2008; Monteny *et al.*, 2001) en la emisión de CH₄, que en el presente trabajo intentaremos distinguir y evaluar. En nuestro caso los valores medios emitidos de CH₄ fueron de 3,2 g an/día (s.e. 0,15) [4,9 L/día¹], o expresada por kg PV^{0,75} fueron de 310,02 (s.e. 12,87), de dicha emisión un 35% correspondió a la emisión procedente de la fosa de deyecciones (1,12 s.e. 0,14 g an/día [1,72 L an/día] o 108,79 s.e. 13,42 mg /kg PV^{0,75}), valores que

¹ Estimado asumiendo una condición de 25°C y 1 atmósfera de presión.

fueron superiores a aquellos con suelos de diferentes tipologías, descritos previamente también en lechones (0,18 a 2,33 [s.e. 0,87]: Cabaraux *et al.*, 2009; Christensen y Thorbek, 1987; Costa y Guarino, 2009; Dong *et al.*, 2007; Montalvo *et al.*, 2013; Nicks *et al.*, 2003) y serían inferiores a los propuestos (10,68 g an/día) por la European Commission (2003).

Tal como se citó previamente no hemos podido encontrar otros trabajos en los que se discrimine la emisión entérica (animal) frente a la emisión de deyecciones (purín). En relación a la emisión total las diferencias deberían estar explicadas por, i) diferencias en los procesos de fermentación entérica y ii) en el manejo de los purines. En relación al primero de los supuestos, el estrecho rango de variación en la composición de las raciones para este tipo de animales limita el impacto potencial de la fermentación entérica sobre la emisión total de metano. Por ello las causas deben ser relacionadas con los niveles de emisión originados en los purines o durante el almacenamiento de las deyecciones. La síntesis de CH₄ en el purín ocurre en condiciones de fermentación en anaerobiosis, por ello el tiempo que las deyecciones están expuestas a la aireación -que limita la producción de CH₄- y depende del tipo de suelo del alojamiento, siendo este tiempo mínimo en el emparrillado y máximo en la yacija, empeorando así la formación de metano (Sommer y Møller, 2000), no obstante, la respuesta es variable, estudios de Philippe *et al.* (2007 y 2007b) donde los niveles de ventilación aparentemente fueron mayores en suelo emparrillado respecto a suelos con cama: la emisión de CH₄ no varió entre ambos tipos de suelo. Otros factores condicionantes que pueden explicar la variabilidad registrada son la temperatura, el pH y la degradabilidad de la MO (Monteny *et al.*, 2006).

Por otra parte el manejo del purín ha demostrado ser un factor determinante en los niveles de emisión, Dong *et al.* (2007) minimizan la emisión de CH₄ al remover el purín de la fosa 2 veces por día. La hidratación del purín, en la medida que pueda suponer un aumento en la relación volumen/superficie incrementarían los niveles de emisión, tal como lo demuestran estudios experimentales de Costa y Guarino (2009) y Osada *et al.* (1998).

Los niveles de emisión absoluta de CH₄ en lechones en transición fueron inferiores a los valores registrados en la fase de cebo (Cap. 5.4.2.1: 4,5 g an/día o 6,86 L/día²), no obstante, cuando se corrigieron dichos valores por el peso metabólico esta respuesta se invirtió (Cap. 5.4.2.1: 310 vs 206 mg/kg PV^{0,75}, para transición vs cebo respectivamente).

En relación a los niveles de emisión de CH₄ procedente del almacenamiento de las deyecciones se observó mayor emisión (g an/día) en transición respecto a crecimiento-inicios de cebo (0,08 y 0,31

² Estimado asumiendo 25 °C y 1 atmósfera de presión.

vs 1,12, para la FI y FII de crecimiento-cebo vs transición, respectivamente), diferencias que fueron más pronunciadas cuando se corrigieron por el peso metabólico ($PV^{0,75}$), independiente de la fase de cebo (Cap. 5.4.2.1). Los niveles de emisión en fosas de transición ponen en manifiesto el efecto del manejo de purín, períodos mayores de permanencia incrementarían el volumen de purín al incrementar su altura o zona de anaerobiosis con lo cual se favorecería el establecimiento-adaptación de las especies metanogénicas (7 vs 36 días de llenado, para engorde vs transición, respectivamente).

El óxido nitroso (N_2O), es emitido de las deyecciones como producto de un proceso de Nitrificación/Desnitrificación deficiente cuando el amoníaco es transformado hasta N_2 molecular (Costa y Guarino, 2009). Su emisión es minoritaria y aunque su capacidad radiativa es muy elevada (298 Eq. CO_2 , Solomon *et al.*, 2007), raramente es incluido en los estudios de emisiones generadas en el purín, ya que a menudo se considera como despreciable (Nicks *et al.*, 2003) en suelos emparrillados (Philippe *et al.*, 2007b).

La emisión total de N_2O fue de 43 mg an/día (0,022 L N_2O /an/día) o 4,17 mg/kg $PV^{0,75}$. No se detectó en el aire evacuado de las CFC. Ello confirmaría que la síntesis de N_2O se efectuó previa a la llegada del purín a la fosa, coincidiendo con Cabaraux *et al.* (2009) y Philippe *et al.* (2007b), quienes indican que el N_2O se originaría en un espacio que podríamos considerar - entre fases, - siendo sobre el piso emparrillado donde se darían las condiciones idóneas para su síntesis. Los resultados obtenidos en la emisión de N_2O son superiores a los descritos por Cabaraux *et al.* (2009) y Montalvo *et al.* (2013), sin embargo, en el rango propuesto por Costa y Guarino (2009) y Dong *et al.* (2007). En general, los datos disponibles en la literatura confirman una gran variación en la emisión de N_2O (0,01 a 0,41 g an/día), aun considerando únicamente pisos emparrillados (Cabaraux *et al.*, 2009; European Commission, 2003; Montalvo *et al.*, 2013; Osada *et al.*, 1998).

Los niveles de emisión de N_2O en lechones en transición fueron siempre inferiores a los valores registrados en la fase de cebo, en valores absolutos representó un 10% (Cap. 5.4.2.3: 0,46 g an/día o 0,26 L/día³) pero incluso cuando se corrigieron por el peso metabólico su emisión media fue una tercera parte de la media registrada en el periodo de cebo (Cap. 5.4.2.3: 14 mg/kg $PV^{0,75}$), no obstante, dichos niveles fueron similares a los registrado al inicio del engorde (Cap. 5.4.2.3, FI: 0,052 g an/día ó 4,35 mg/kg $PV^{0,75}$).

³ Asumiendo 25 °C y 1 atmósfera de presión.

Tabla 5.3.4. Parámetros productivos y emisión de NH₃ y GEI obtenidos a partir de datos bibliográficos registrados en explotaciones de ganado porcino en fase de transición.

Empa- rrillado	Peso vivo (kg)		PB%	FB%	GMD (g)	IC	L H ₂ O	°C Módulo	Emisión g an/día			Fuente
	Inicio	Fin							NH ₃	CH ₄	N ₂ O	
Paja	7,2 s.e.1,2	23,7 s.e. 3,3	17,5 y 17,6	3,9 y 4,3	387 s.e. 65	1,57	1,6	23,9 s.e. 1,6	0,61	0,75	0,03	[1]®
Total	7,2 s.e.1,2	23,4 s.e. 3,3			379 s.e. 64	1,74	1,5	26,4 s.e. 1,6	0,31	0,91	0,00	[1]
Serrín	7,1 s.e.1,1	22,2 s.e. 2,7			377 s.e. 63	1,64	1,8	16,3 s.e. 1,6	0,55	0,52	0,32	[1]
Total	7,1 s.e.1,0	22,6 s.e. 3,3			386 s.e. 70	1,69	1,5	22,6 s.e. 0,9	0,36	0,86	0,01	[1]
	22,2 y 23,1 < 30		16,5	4,8				24		0,87-1,08		[2]
									0,16-2,2	10,68		[3]
Total	20							19,0-27,6		0,18	0,045	[4]&
								25,6-27,4		0,94	0,16	[4]&
								23,5-27,3		1,83	0,23	[4]&
Total	17	20	20,9					28		2,33 s.e. 0,87	0,05 s.e. 0,01	[5] [†] &
Total	13 s.e. 2,4	33	19,7	3,8	590 s.e. 47	1,82	5,3	25-23	0,46	0,45	0,022	[6] ^x
			19,7 ^{PR}	5,5	571 s.e. 47	1,94	5	25-23	0,18	0,31	0,024	[6] ^x
			16,6	3,8	632 s.e. 47	1,84	5,4	25-23	0,26	0,55	0,025	[6] ^x
			19,7 ^{AB}	3,8	592 s.e. 47	1,85	5,8	25-23	0,42	0,50	0,022	[6] ^x
			16,6 ^{PR+AB}	5,5	571 s.e. 47	2,11	3,9	25-23	0,22	0,56	0,028	[6] ^x
Paja	7,7 s.e.0,3	24,6 s.e. 2,8	17,2 y 18,1	4,0 y 4,4	397 s.e. 40	1,80	1,86	23,7	1,21	1,58	0,36	[7]®
Serrín	7,7 s.e.1,3	24,8 s.e. 2,1			402 s.e. 28	1,79	1,81	23,0	0,46	0,77	1,39	[7]®

[†] Ventilación natural y limpieza del piso dos veces al día; & Valores estimados a partir de una unidad ganadera (500 kgPV); ^x Valores para 22 kgPV, a partir del valor medio (mg/kgPV) de 28 días de medición donde la fosa se vació a 7, 21 y 28 días; ® Alimento inicial pre-estárter y estárter; ^{PR} Pulpa de remolacha; ^{AB} Ácido benzoico.

[1] Cabaraux *et al.* (2009)[®]; [2] Christensen y Thorbek (1987); [3] European Commission (2003); [4] Costa y Guarino (2009); [5] Dong *et al.* (2007)[†]; [6] Montalvo *et al.* (2013)^x: s.e. NH₃=0,015, CH₄=0,019, N₂O=0,0016; [7] Nicks *et al.* (2003)[®].

5.3.5. Producción y composición del purín en cerdos en transición.

En la Tabla 5.3.4 se presentan los resultados obtenidos correspondientes al purín generado durante la fase de transición. El volumen medio (42 días) (L an/día) varió entre módulos (4,6 y 7,4 L an/día, para M1 y M2, respectivamente), dichos valores fueron superiores a los descritos previamente por Álvarez-Rodríguez *et al.* (2013) para animales entre los 20-40 kg PV. Aunque se situarían en el rango de producción (1-12 L an/día) permitido legalmente (Decreto 136/2009, DOGC nº 5457-3.9.2009). La producción de purín corresponde al volumen de excretas, pienso residual y agua rehusada, por tanto la hidratación debería alterar el contenido de MS y la concentración de compuestos así al corregir por los niveles de MS los niveles fueron similares.

La concentración de N en purín es un índice de la eficiencia del N y a su vez determinaría el valor de dicho sustrato como fertilizante, la composición (kg/m³) media del N registrado fue de 1,34 d.e. 0,13 de N orgánico y 0,88 d.e. 0,135 (N-NH₄). Los valores registrados son, en general menores a los obtenidos en el purín procedente de animales adultos y con ello un menor valor como fertilizante. El caso contrario se observó con las concentraciones de Fósforo y Potasio (g/kg MS) que fue superior a la registrada en los animales de mayor peso y edad (20-40 kg PV; Alvarez-Rodriguez *et al.*, 2013),

Tabla 5.3.5. Composición analítica y valor fertilizante del purín procedente de las fosas de cerdos en transición muestreado a los 38 días).

Ítem	Media
Volumen (L/día) ¹	5,99±1,97
Composición	
Densidad (g/L)	1,00±0,0
EC (dS/m)	8,84±1,77
pH	6,90±0,19
MS (g/kg)	11,90±0,80
N-org. (g/kg MS)	37,85±19,7
N-NH ₄ (g/kg MS)	74,00±16,7
P (g/kg MS)	58,03±7,01
K (g/kg MS)	56,84±16,5
Valor fertilizante	
N-NH ₄ (kg/m ³)	0,88±0,13
N total (kg/m ³)	1,34±0,13
P (kg/m ³)	0,70±0,13
K (kg/m ³)	0,69±0,25

¹ Litros de purín por an/día durante el ciclo de la transición

5.4. Efecto del nivel de fibra y proteína de la ración sobre los parámetros productivos y la emisión gaseosa en cerdos en cebo.

5.4.1. Efecto del nivel de fibra y proteína de la ración sobre los parámetros productivos.

5.4.1.1. Resultados.

5.4.1.1.1. Crecimiento.

No se observó una interacción entre el efecto de la PB y la Fibra (FND) sobre los parámetros productivos ($P>0,05$), por tanto ambos factores actuaron de forma independiente sobre los niveles de ingestión, las variaciones en el peso vivo (PV) y la eficiencia en crecimiento. El consumo de MS durante el periodo de cebo no fue alterado por el nivel de PB en la dieta ($P>0,05$; Tabla 5.4.1.1). El incremento en la proporción de FND si redujo los niveles de consumo y ello fue así entre las 17 y 21 semanas de edad ($P<0,05$). La evolución del peso vivo durante el periodo cebo fue modificada por la PB en la ración ($P<0,001$). Los cerdos alimentados con niveles más altos de proteína (AP) mostraron mayor ganancia media diaria (GMD) y PV a partir de las 12 semanas de edad ($P<0,05$), vinculada a mayor eficiencia en la conversión de alimento (IC) y mayor eficiencia en el uso de la energía en este grupo, siempre comparando los valores registrados con el tratamiento control ($P<0,05$). El nivel de FND no tuvo efecto sobre el crecimiento, índice de transformación o la eficiencia de utilización de la energía ($P>0,05$).

Las determinaciones *in vivo* del espesor de la grasa dorsal (Posición P2, ver apartado 4.4.2.4a) no difirieron entre los animales que recibieron distintos niveles de PB ($P>0,05$) o FND ($P>0,05$) durante el periodo de cebo, aunque dicho nivel incrementó de forma constante entre las 12 y 21 semanas de edad (de 4,6 a 11,1 s.e. 0,19 mm; $P<0,001$).

Tabla 5.4.1.1. Parámetros productivos [peso vivo, PV; ingestión media diaria (IMD); ganancia media diaria (GMD); índice de conversión (IC); y eficiencia energética calculada] para cerdos en crecimiento-cebo, alimentados a distintos niveles de PB (alta, AP vs baja, BP) y/o FND (normal, NF vs alta, AF) de la ración entre las 6 y 21 semanas de edad (FI: 6-11, FII: 12-16, FIII: 17-21 semanas).

Ítem	PB		FND		s.e.	P-valores	
	AP	BP	NF	AF		PB×Fase	FND×Fase
IMD en FI, kg/d	1,21	1,26	1,25	1,22			
IMD en FII, kg/d	2,27	2,29	2,33	2,23	0,036	0,3724	0,0426
IMD en FIII, kg/d	2,87	2,85	2,94 ^x	2,78 ^y			
IMD promedio, kg/d	2,12	2,13	2,17 ^x	2,07 ^y	0,029	0,7304	0,0186
PV inicial: a 6 semanas, kg	13,7	13,9	13,9	13,7			
PV a 12 semanas, kg	39,1	38,2	39,2	38,0	1,38	<,0001	0,1055
PV a 17 semanas, kg	75,1 ^a	70,5 ^b	74,3	71,4			
PV final: 21 semanas, kg	114,6 ^a	102,8 ^b	110,9	106,5			
GMD en FI, g/d	756	718	750	725			
GMD en FII, g/d	1.007 ^a	889 ^b	982	915	28,0	0,0012	0,7226
GMD en FIII, g/d	1.125 ^a	892 ^b	1.030	988			
GMD promedio, g/d	963 ^a	833 ^b	920	876	17,8	<,0001	0,0757
IC en FI, g/g	1,89	2,10	1,94	2,05			
IC en FII, g/g	2,28 ^b	2,65 ^a	2,44	2,49	0,076	0,0131	0,8865
IC en FIII, g/g	2,78 ^b	3,38 ^a	3,06	3,11			
IC promedio, g/g	2,32 ^b	2,71 ^a	2,48	2,55	0,055	<,0001	0,3707
Eficiencia energética ¹ (FI)	1,02	1,01	0,99	1,05			
Eficiencia energética (FII)	1,16 ^b	1,27 ^a	1,21	1,23	0,025	<,0001	0,5293
Eficiencia energética (FIII)	1,26 ^b	1,42 ^a	1,32	1,36			
Eficiencia energética promedio	1,15 ^b	1,23 ^a	1,17	1,21	0,019	0,0036	0,1442

Dentro de cada fila, medias sin común superíndice (nivel de PB: ^{a, b} y FND: ^{x, y}) difieren ($P < 0,05$).

¹Eficiencia energética calculada mediante la EM ingerida / (EM necesaria para mantenimiento + EM necesaria para crecimiento).

5.4.1.1.2. Digestibilidad.

Los coeficientes de digestibilidad aparente a las 11, 16 y 21 semanas de edad se muestran en la tabla 5.4.1.2. La interacción entre los niveles dietéticos de PB y FND no afectó a la digestibilidad aparente de la MS, MO, EE y CHO, y por ello en la tabla 5.4.1.2 se presentan los valores correspondientes a los efectos principales.

A 11 semanas de edad (Tabla 5.4.1.2), al reducir los niveles de PB de la ración disminuyó la digestibilidad aparente de la MS y CHO ($P < 0,05$), sin embargo, con la madurez de los cerdos dichas diferencias desaparecieron. Al reducir el aporte de PB se redujo también la digestibilidad del EE a las 11 y 21 semanas, respectivamente.

En relación al nivel FND de la ración, raciones con un elevado porcentaje de fibra (AF) mostraron mayores tasas de digestibilidad aparente de la MS a las 11 y 16 semanas de edad ($P < 0,05$) y una

mayor digestibilidad del EE durante todo el periodo de cebo ($P < 0,05$). Contrariamente, la digestibilidad de los CHO a partir de las 21 semanas de edad se redujo de forma significativa al incrementar el nivel de FND ($P < 0,05$).

La digestibilidad aparente de la FND fue dependiente del nivel de PB y FND de la ración (Interacción PB x FND: $P = 0,007$; Figura 5.4.1.1c). En los animales que ingirieron las raciones con un nivel bajo (normal) de FND, al reducir el nivel de PB también se redujo la digestibilidad de la fibra (BP-NF: 44,99%), aunque estas diferencia no se pudieron detectar cuando los animales fueron alimentados con el nivel alto de fibra (BP-AF: 54,80%), comparando siempre dichos valores con las raciones con elevados niveles de PB (AP-NF: 54,56% y AP-AF: $58,34 \pm 1,09\%$).

No se registraron diferencias significativas en el coeficiente de digestibilidad aparente de la PB entre las semanas 11 y 16 (73,8 vs 73,6 s.e. 0,72%), pero incrementó a las 21 semanas (77,3 s.e. 0,72%; $P < 0,001$). El efecto contrario se observó en las tasas de digestibilidad aparente de la FND, que fue mayor entre las 11 y 16 semanas de edad que al final del engorde (53,6 y 54,6 vs 51,2 s.e. 0,94% respectivamente; $P < 0,05$).

5.4.1.1.3. Cantidad de nutrientes digeridos a través del tracto intestinal.

A 11 semanas de edad, la cantidad de MS y MO digerida no difirió entre niveles de PB ($P > 0,10$), no obstante, la cantidad de CHO digeridos fue superior en los animales que recibieron raciones con bajos niveles de proteína (BP) en relación a los que recibieron las raciones con un mayor contenido (AP; $P = 0,04$). A partir de las 21 semanas de edad, la cantidad de MS, MO y CHO fue mayor en aquellos animales que ingerían raciones con un bajo contenido de PB en relación a los alimentados con los niveles altos (AP; $P < 0,05$).

Por otra parte, a las 21 semanas de edad los cerdos alimentados con dietas elevadas en contenido en fibra mostraron una reducción en la cantidad de MS, MO y CHO digeridos ($P < 0,05$), aunque mejoró la digestión del EE (de las 16 y 21 semanas de edad, $P < 0,05$).

Del mismo modo, la cantidad de PB digerida (g/d) fue modificada por la interacción entre PB y FND ($P = 0,02$; Figura 5.4.1.1b). Así cuando los animales recibieron raciones con un elevado nivel de proteína (AP) digirieron mayor cantidad de PB cuando el nivel de FND de la ración fue bajo o normal (AP-NF: 327,2 g PB/d), en relación a la digestión de aquellos cerdos que recibieron el nivel alto de FND (AP-AF: 311,1 s.e. 5,37 g PB/d, $P < 0,05$). Las menores digestiones de PB (g/d) se observó en las raciones con un bajo nivel de PB (BP-NF 252,6 g PB/d y BP-AF: 260,6 s.e. 5,37 g PB/d). La cantidad

de PB digerida incrementó linealmente de la 11 a la 21 semana de edad ($242,3$, $331,8$ y $348,7 \pm 4,58$ g/d, $P < 0,001$).

No se apreció significación entre la interacción PB x FND cuando los resultados se expresaron como FND digerida (en g/d) ($P = 0,24$). En este caso, con independencia del nivel de PB, las raciones con un nivel bajo o normal de FND mostraron menor cantidad de FND digerida (Figura 5.4.1.1d; $P < 0,05$). En relación a la edad, citar que la cantidad de FND digerida fue menor a las 11 semanas de edad e incrementó de las 16 a las 21 semanas ($128,3$ vs $226,0$ y $230,0$ s.e. $3,83$ g/d, respectivamente; $P < 0,05$).

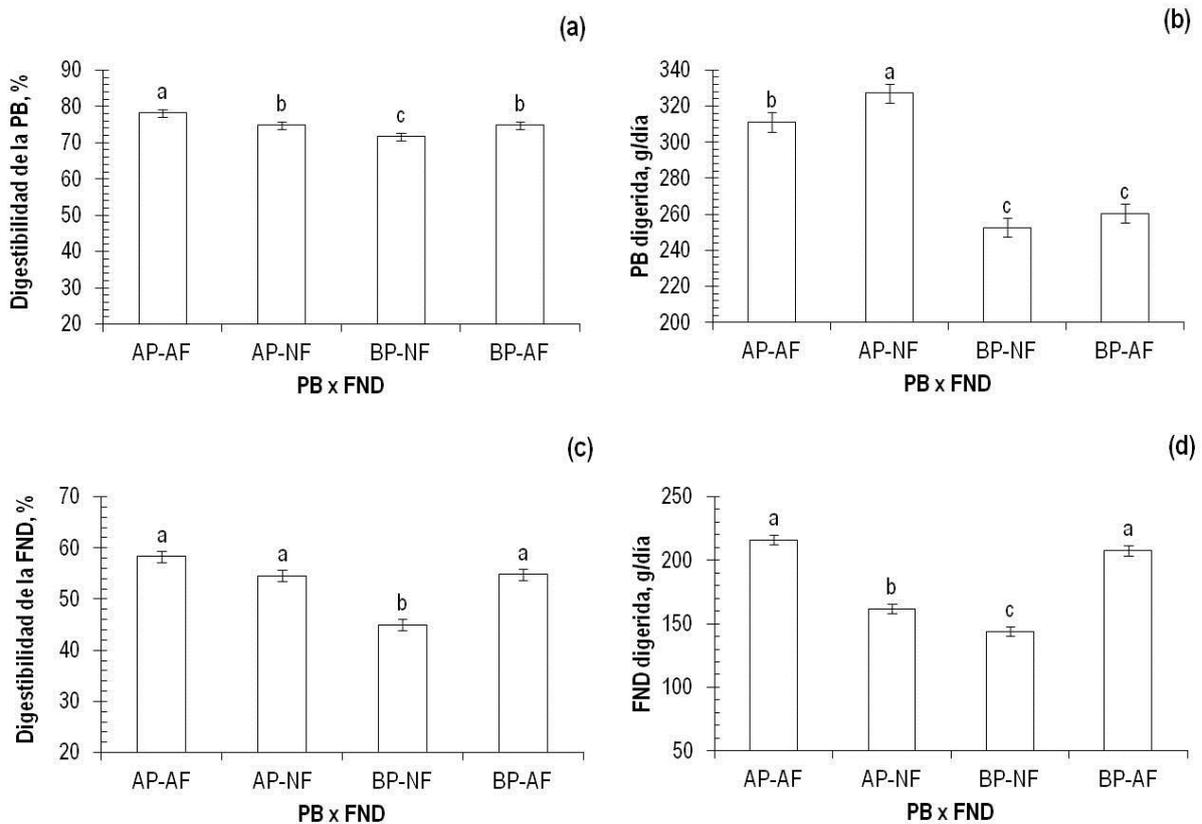


Figura 5.4.1.1. Coeficiente de digestibilidad aparente de la PB (%) (a), cantidad de PB digerida (g/d) (b), coeficiente de digestibilidad aparente de la FND (%) (c), y la cantidad digerida de FND (g/d) (d). Como afectados de la interacción entre el contenido de PB (alta, AP vs baja, BP) y FND de la dieta (normal, NF vs alta, AF) ($P < 0,01$) suministrada a cerdos en crecimiento-cebo entre las 6 y 21 semanas de edad. Por encima de cada barra, letras diferentes (a, b) indican diferencias significativas entre combinaciones de efectos ($P < 0,05$). Barras de error = s.e.

Tabla 5.4.1.2. Coeficiente de digestibilidad aparente (%) y cantidad de nutrientes digeridos (kg/d o g/d) para cerdos en crecimiento-engorde afectados por el nivel de PB (alta, AP vs baja, BP) y/o FND (normal, NF vs alta, AF) de la dieta suministrada de 6 a 21 semanas (s) de edad.

Ítem	Edad (s)	PB		FND		s.e.	P-valor	
		AP	BP	NF	AF		PB×Fase	FND×Fase
Digestibilidad de la MS, %	11	95,33 ^a	94,23 ^b	94,34 ^y	95,22 ^x	0,189	0,0014	0,0063
	16	94,39	94,61	94,10 ^y	94,91 ^x			
	21	94,40	94,00	94,27	94,12			
MS digerida, kg/d	11	1,46	1,52	1,47	1,52	0,031	0,0102	<,0001
	16	2,28	2,35	2,37 ^x	2,27 ^y			
	21	2,43 ^b	2,62 ^a	2,62 ^x	2,43 ^y			
Digestibilidad de MO, %	11	82,75	80,14	80,73	82,16	0,544	0,0744	0,3147
	16	83,34	83,05	82,64	83,75			
	21	84,74	83,71	84,25	84,20			
MO digerida, kg/d	11	1,03	1,11	1,05	1,09	0,028	0,4991	0,0005
	16	1,73	1,74	1,74	1,73			
	21	2,13	2,18	2,25 ^x	2,06 ^y			
Digestibilidad del EE, %	11	63,34 ^a	54,55 ^b	55,19 ^y	62,70 ^x	1,374	0,011	0,0035
	16	68,88	68,66	63,69 ^y	73,85 ^x			
	21	67,92 ^a	63,80 ^b	57,39 ^y	74,33 ^x			
EE digerido, g/d	11	46,40	43,02	41,57	47,84	2,432	0,4649	<,0001
	16	93,85	94,77	75,87 ^y	112,75 ^x			
	21	110,87	105,94	80,79 ^y	136,02 ^x			
Digestibilidad de CHO, %	11	86,82 ^a	84,37 ^b	85,06	86,14	0,417	0,0319	0,0006
	16	87,15	86,67	86,95	86,87			
	21	87,54	86,80	88,23 ^x	86,13 ^y			
CHO digeridos, kg/d	11	0,76 ^b	0,86 ^a	0,78	0,82	0,022	0,0428	<,0001
	16	1,31	1,37	1,36	1,33			
	21	1,61 ^b	1,78 ^a	1,82 ^x	1,58 ^y			

Dentro de fila, medias sin común superíndice (nivel de PB: ^{a, b} y FND: ^{x, y}) difieren ($P < 0,05$).

5.4.1.1.4. Producción y composición del purín.

La excreción fecal en base materia MS no fue alterada por el nivel de PB y FND a 11 semanas de edad (Figura 5.4.1.2; $P > 0,1$), sin embargo, el menor contenido de PB en la dieta incrementó la excreción fecal a 21 semanas de edad ($P < 0,001$), mientras el incremento de FND en la dieta indujo mayor excreción fecal a partir de las 16 semanas de edad ($P < 0,001$).

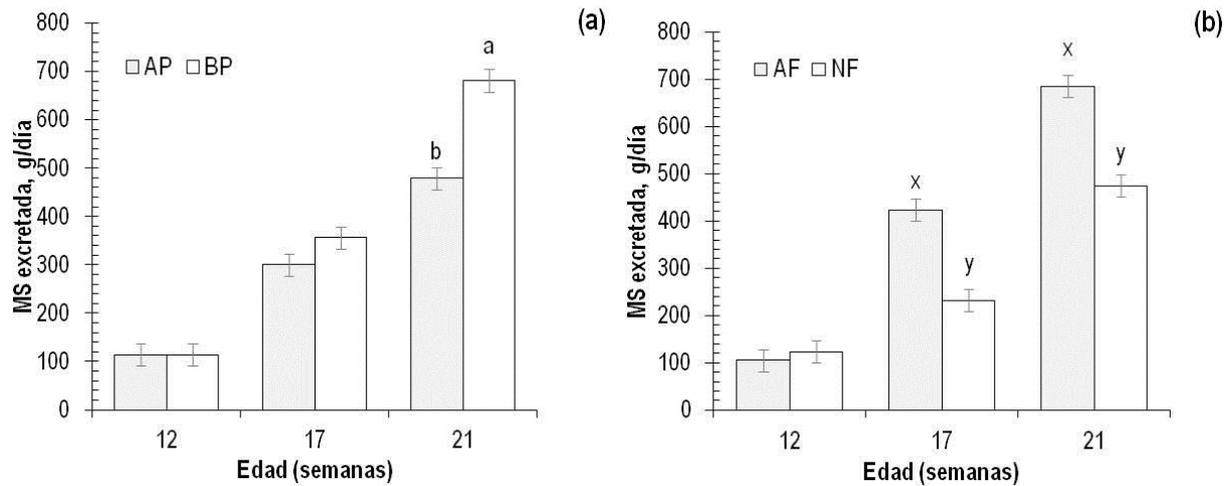


Figura 5.4.1.2. Excreción fecal de material seca (MS) en cerdos en crecimiento-cebo, como efecto del nivel de PB [alto, AP vs bajo, BP] (a) y/o de FND en la dieta [alta, AF vs normal, NF] (b). Por encima de cada barra, letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$) entre el nivel de PB (a, b) y/o FND (x, y). Barras de error = s.e.

La densidad y conductividad eléctrica (CE) del purín no se diferenciaron hasta las 16 semanas de edad (1.015 s.e. 5 kg/m³ y 14,72 s.e. 1,42 dS/m), para incrementar posteriormente (1.029 s.e. 4 kg/m³ y 18,37 s.e. 1,15 dS/m). Además, ambos parámetros (densidad y CE) mostraron mayores valores en purín de cerdos alimentados con alta PB y alta FND comparada con el resto de tratamientos ($P=0,003$ y $P=0,002$, respectivamente; Figura 5.4.1.3). El pH del purín fue mayor cuando este procedía de cerdos alimentados con dietas AP que en BP (7,42 vs 7,18 s.e. 0,08; $P=0,05$), mientras el nivel de FND en la dieta y la fase de crecimiento no modificaron dichos niveles ($P=0,07$ y $P=0,66$, respectivamente). Los principales macronutrientes desde el punto de vista agronómico, no se vieron afectados por el nivel de PB, FND o fase de crecimiento (promedio de N-orgánico: 37,5 s.e. 10,1 g/kg MS; NH₄-N: 52,6 s.e. 13,6 g/kg MS; P: 42,6 s.e. 2,1 g/kg MS y K: 62,5 s.e. 12,3 g/kg MS; todas con $P > 0,08$).

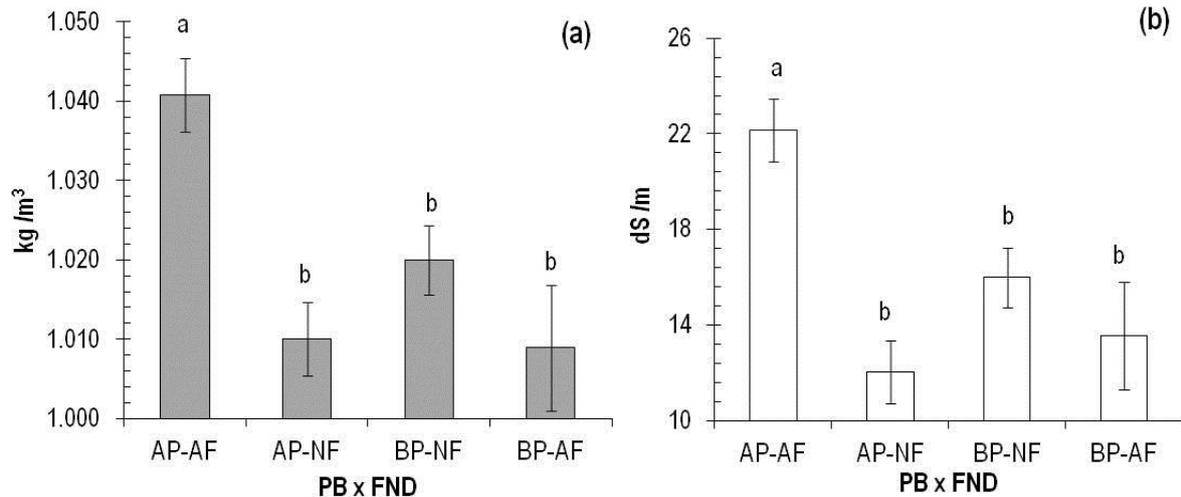


Figura 5.4.1.3. Densidad (kg/m^3) (a) y la conductividad eléctrica (EC) (dS/m) (b) del purín de cerdos en crecimiento-engorde (6 a 21 semanas de edad) como efectos de la interacción entre el nivel de PB dietaria (alta, AP vs baja, BP) y el nivel FND (normal, NF vs alta, AF) ($P < 0,01$). Sobre cada barra, medias sin común letra (a, b) difieren ($P < 0,05$). Barras de error = s.e.

5.4.1.1.5. Características de la canal.

No se observó interacción entre los efectos de la PB y la FND sobre las características de la canal ($P > 0,25$), actuando ambos factores de forma independiente en estos parámetros. Así, el contenido de PB o FND en la dieta no afectó significativamente el rendimiento en canal y la clasificación de canales acorde con la Normativa Nacional Española (Tabla 5.4.1.3). Sin embargo, ambos efectos (PB y FND) afectaron el espesor graso dorsal (medida entre la 3 y 4 últimas costillas), aumentando significativamente al reducir la PB ($P < 0,001$) y aumentar la FND de la ración ($P = 0,03$).

Tabla 5.4.1.3. Parámetros de rendimiento en la canal, afectados por el nivel de PB (alta, AP vs baja, BP) y/o contenido de FND (normal, NF vs alta AF) de la ración suministrada durante su crecimiento-engorde.

Ítem	PB		FND		<i>P</i> -valor†	
	AP	BP	NF	AF	PB	FND
Peso de canal, kg	75,42	75,61	75,89	75,13	0,71	0,12
Rendimiento canal, %	71,79	71,02	71,30	70,49	0,66	0,09
EGD (3 ^a -4 ^a últimas costillas), mm	13,51 ^b	16,06 ^a	14,09 ^y	15,47 ^x	<0,001	0,03
Clasificación de canal‡	95,7% R, 4,3% O	79,2% R, 20,8% O	87,5% R, 12,5% O	87,0% R, 13,0% O	0,09	0,95

Dentro de cada fila y efecto (PB o FND), medias sin común superíndice (PB: ^{a,b}) (FND: ^{x,y}) difieren ($P < 0,05$).

† Interacción PB x FND = todos los parámetros con $P > 0,25$.

‡ Clasificación según la SEUROP (BOE, 2011): R = 45,1 a 50% carne magra; O = 40 a 45% carne magra.

EGD: Espesor de grasa dorsal.

5.4.1.2. Discusión.

5.4.1.2.1. Efecto del nivel de PB.

A pesar de que el consumo de alimento no difirió entre los niveles de PB, el crecimiento de los cerdos alimentados con dietas bajas en PB fue menor que los alimentados con dietas altas en PB, y ello fue así a partir de las 12 semanas de edad lo que implicó una reducción en el IC del 17,8% (12-16 semanas de edad) y 14% (17 a 21 semanas de edad). De este modo, la eficiencia de utilización de la energía para el mantenimiento y crecimiento se redujo. En ensayos de dosis-respuesta utilizando cerdos cruzados Large White x (Large White x Landrace) entre 45-95 kg de PV se observó que reducciones de los niveles de PB en la ración hasta los 122,5 g/kg (Carpenter *et al.*, 2004) o 140 g/kg (Madrid *et al.*, 2013) no deprimieron ni el consumo de alimento, ni la ganancia diaria de peso y ni el IC. En este sentido, algunos autores concluyen que las respuestas en crecimiento no se verían afectadas hasta que la reducción de PB alcanzase los 120 g/kg, en cuya situación uno o más aminoácidos limitarían el crecimiento (Figuroa *et al.*, 2002).

Estudios de Gloaguen *et al.* (2014) proponen que las necesidades de N deben ser expresados mediante la tasa N: Lys que permita mantener los ritmos de crecimiento, considerando además las necesidades de N no proteico y AA, esenciales y no esenciales. Estos autores determinan que el óptimo de N digerible en relación a Lys-Digestible Estandarizada se situó entre 19,1 g/kg y 20,4 g/kg. En este estudio, las dietas bajas en PB alcanzaron un ratio mayor de digestibilidad N:DIS Lys (23,0 a 30,5 g/kg) que los valores antes mencionados, pero aun así las tasas de crecimiento se vieron reducidas. Ello sugiere que, aunque raciones utilizadas bajas en PB fueron formuladas siguiendo el equilibrio de la proteína ideal, ciertos aminoácidos pudieron limitar los niveles de deposición proteica. De hecho, las recientes guías españolas para la formulación de la alimentación de cerdos han sido actualizadas (FEDNA, 2013) con el fin de adaptar las recomendaciones a los genotipos seleccionados para que puedan responder positivamente a una mayor oferta de nutrientes. En consecuencia, asumiendo que la lisina sería el primer aminoácido limitante y que el balance de proteína ideal se mantendría, su nivel en la dieta debe ser superior a 9,1 g/kg entre 12 a 16 semanas de edad y 6,7 g/kg de 17 a 21 semanas de edad para permitir un crecimiento óptimo.

En determinadas fases del engorde (entre las 11 y 21 semanas) al reducir el contenido en PB de la ración se redujo la digestibilidad del extracto etéreo, aunque la cantidad digerida no difirió entre tratamientos y ello fue así debido a que los animales que recibieron las raciones con bajos niveles de PB mostraron numéricamente un mayor consumo de alimento a las 21 semanas de edad, en

comparación con sus homólogos alimentados con raciones a elevados niveles de PB. Ello podría estar relacionado con una mejora en la digestión de la fracción de hidratos de carbono no estructurales (i.e. almidón), ya que la cantidad digerida de extracto etéreo no fue diferente y las cantidades digeridas de PB y FND decrecieron cuando se suministraron raciones con bajos niveles de PB.

Mientras que el rendimiento de la canal no se vio afectado por el nivel de PB de la dieta, el espesor de grasa dorsal aumentó. Por tanto, la manipulación del contenido en PB de la ración redujo el valor comercial de la canal. Previamente otros autores describieron esta relación (i.e. Kerr *et al.*, 1995, 2003; Madrid *et al.*, 2013; Wood *et al.*, 2013), aunque en ningún caso la justificaron. Asumiendo que la tasa de deposición proteica y lipídica depende del potencial de crecimiento del tejido magro del animal y la relación energía:proteína de la ración, el incremento del espesor de la grasa dorsal podría estar determinada por una utilización más eficiente de la energía, dada i) la reducción en la pérdida de calor por catabolismo, y ii) la reducción en los niveles de excreción del N excedentario (Kerr *et al.*, 2003; Madrid *et al.*, 2013).

Otra posible causa de la reducción en los niveles de crecimiento podría ser debida a que la reducción en los niveles de PB no pudiera mantener el equilibrio en los aportes de los AA sulfurados y la relación treonina: lisina, que como es sabido incrementan con la edad del animal (Tuitoek *et al.*, 1997). Aunque las raciones con bajos contenidos en PB pueden reducir las emisiones de nitrógeno y mejorar la calidad organoléptica de la carne (Wood *et al.*, 2013), el margen económico en las condiciones actuales no parecen sustentar esta estrategia.

5.4.1.2.2. Efecto del incremento en el nivel de FND a partir de la inclusión de pulpa de remolacha.

En el presente estudio, al incrementar el aporte de FND en la ración se redujo el consumo de alimento al final del cebo, pero no redujo el IC y la eficiencia energética, aunque se apreció una tendencia a la disminución del rendimiento de la canal y al aumento del espesor de la grasa dorsal. Se ha hipotetizado que el cerdo puede tolerar un amplio rango de concentraciones de fibra en la ración, siempre que la densidad energética sea la adecuada (Baird *et al.*, 1975; Beaulieu *et al.*, 2009; Gutierrez *et al.*, 2013). La ligera disminución en el rendimiento de la canal podría ser atribuida a un aumento de contenido intestinal junto con un mayor desarrollo de órganos, aunque este efecto sería prácticamente indetectable considerando los periodos de ayuno utilizados (12-24 h) (Santomá, 1997).

El efecto de la FND dietética sobre los parámetros del crecimiento y características de la canal podrían estar enmascarados por las variaciones en los niveles de PB. Al suplementar la ración por

encima de las necesidades de AA en aquellos cerdos que recibían a la vez, bajos niveles de PB y altos niveles FND incrementaría el tejido magro de la canal, pero se reducirían los niveles de crecimiento (Jha *et al.*, 2013). De hecho, se ha demostrado que las necesidades de treonina pueden incrementar como resultado de elevados niveles de ingestión de fibra, la treonina es uno de los principales constituyentes de la mucina que puede ser secretada en el lumen intestinal en función de flujo de fibra fermentable (Zhu *et al.*, 2005).

El incremento de FND en la dieta no modificó el pH a lo largo del tracto gastrointestinal y/o el purín, en acuerdo con Shriver *et al.* (2003), aunque si se han descrito menores niveles de pH en las excretas al incrementar los niveles de ingestión de fibra (Lynch *et al.*, 2008). En el presente estudio, se observó un incremento en la excreción de materia fresca fecal al incrementar el aporte dietético de fibra soluble. Un aumento en la ingestión de fibra incrementará la actividad del intestino grueso, dada la propia acción mecánica de la fibra y la capacidad de retención de agua, que aumentan el volumen en el colon y heces (Bach Knudsen y Hansen, 1991).

A pesar que el aumento en FND de la dieta provocó un incremento en la tasa de digestibilidad de la MS en las semanas 11 y 16 de edad, la cantidad de MS, MO y CHO digeridos al final del período de cebo fue menor en las raciones con alto contenido de fibra.

Además, el incremento en el aporte de FND implicó un incremento en las tasas de digestibilidad del extracto etéreo. Según Noblet y Shi (1993), existe una relación curvilínea entre el aporte dietético de EE y su digestibilidad aparente, reduciéndose esta última cuando el contenido de fibra de la dieta es superior a 200 gFND/kg. En el presente estudio los niveles de FND en dietas AF se situaron por debajo de este umbral. Es necesario señalar que la presencia en la ración basal de ingredientes que contienen ciertos niveles de fibra (cebada, trigo y harina de soja) y lípidos podría reducir el impacto de la FND procedente de la pulpa sobre la digestibilidad.

5.4.1.2.3. Estudio del efecto de la interacción entre el aporte de PB y FND.

En el presente estudio, el rendimiento productivo y las características de la canal no fueron afectados por la interacción entre la PB y FND de la dieta. Por lo tanto, el efecto de la reducción de los niveles de PB, en la mayoría de los caracteres estudiados, fue independiente del nivel de FND suministrado. Paralelamente, los efectos inducidos por los incrementos en el aporte de FND fueron también independientes del aporte de PB. La independencia de ambos factores, PB y FND sobre el consumo y niveles de crecimiento fue demostrado previamente en lechones tras su destete (9 a 18 kg

PV) (Hermes *et al.*, 2009) utilizando salvado de trigo y pulpa de remolacha, y en cebo (30 a 115 kg PV) (Jha *et al.*, 2013) utilizando subproductos ricos en fibra derivados del procesado de etanol, en ambos casos como fuentes de fibra.

Sin embargo, al incrementar el aporte de FND sin disminuir el de PB produjo una reducción de la digestibilidad aparente de la PB e incrementó la cantidad de materia seca excretada, como lo prueban las características físico-químicas en purín (CE y densidad). De hecho, al incrementar el aporte de FND se incrementa la retención de nitrógeno en el intestino grueso para el crecimiento de microorganismos, pero también incrementa la excreción de nitrógeno fecal (Malmlöf y Hakansson, 1984). El papel intestinal de la fibra puede estar mediado por el flujo de carbohidratos fermentables a intestino grueso, que a su vez aumenta el crecimiento microbiano y ello puede incrementar la recanalización de urea plasmática a intestino grueso para la síntesis de proteína microbiana (Shriver *et al.*, 2003).

En el presente estudio, al incrementar el aporte dietético de FND (170 g FND/kg para dietas altas en FND mediante la inclusión de 50 g/kg de pulpa de remolacha más la contribución de los cereales utilizados) sólo afectó negativamente al coeficiente de digestibilidad aparente de la PB cuando se administraron raciones con una alta proporción de PB (175 g PB/kg), pero no en dietas con una baja proporción (125,5 g PB/kg). Algunos estudios muestran que la correlación negativa entre digestibilidad aparente de la PB y el contenido de fibra (200 g/kg de pulpa de remolacha, resultando en 185 g FND/kg) es independiente del nivel de PB (200 vs 150 g PB/kg de alimento) (Lynch *et al.*, 2008: en cerdos de 75 a 95 kg de PV). Aunque, en otros trabajos si se ha detectado una ligera reducción del coeficiente de digestibilidad aparente debida a un alto contenido en fibra (177 g FND/kg alimento) en dietas con bajos contenidos en proteína (157 g PB/kg) (Zervas y Zijlstra, 2002: en cerdos de 25 a 40 kg PV).

También se ha demostrado que aumentar la FND en la dieta puede disminuir la digestibilidad aparente de la PB debido al incremento de pérdidas endógenas de aminoácidos (Schulze *et al.*, 1994). A su vez, la grasa puede también incrementar la digestibilidad aparente de la PB (Imbeah y Sauer, 1991) en la medida que la grasa pueda reducir el ritmo de paso de la digesta y proporcionar así más tiempo para que las enzimas proteolíticas puedan hidrolizar los sustratos proteicos de la digesta (Kil *et al.*, 2013), sin que ello afecte las pérdidas endógenas de aminoácidos (de Lange *et al.*, 1989). Por lo tanto, el alto contenido de extracto etéreo en dietas con AF en la Fase II (12 a 16 semanas de edad) y III (17 a 21 semanas de edad) necesaria para formular dietas isoenergéticas, podría haber compensado el impacto negativo de la FND sobre la digestión de la PB.

5.4.2. Efecto del nivel de fibra y proteína de la ración sobre la emisión gases tóxicos: CH₄ y gases nitrogenados (NH₃ y N₂O).

En este apartado se presentan los valores de emisión para los gases contaminantes objeto del presente estudio, metano (CH₄) y gases nitrogenados (NH₃ y N₂O) en condiciones que se pretendió que reflejasen las condiciones de explotación comercial. No se detectaron incidencias remarcables que pudiesen invalidar los resultados obtenidos, así los índices de morbilidad y mortalidad no difirieron a los registros en las granjas comerciales (Agostini *et al.*, 2013; Grupo Gestión Porcina, 2012; SIP Consultors, 2013) y los índices productivos que se expusieron y discutieron en el apartado anterior se situarían en los rangos descritos para este cruce (Landrace x Large-White) y condiciones de explotación (ver apartado 5.4.1).

La presentación de los resultados correspondientes a las emisiones gaseosas se realizará en función de su origen, es decir se distinguirán las emisiones totales procedentes del conjunto, que incluiría la emisión entérica y la procedente de la evaporación inmediata, tanto cutánea como de las superficies del alojamiento (emparrillado, vallas, etc.), esta emisión se distinguirá de aquella procedente del almacenamiento de las deyecciones [emisiones en fosa]. La emisión procedente de la evaporación y la derivada del almacenamiento de deyecciones en la fosa van a ser dependientes de las condiciones ambientales y concretamente la temperatura, humedad y pH que han demostrado ser cruciales en la determinación de los niveles de emisión. Por ello este capítulo se iniciará con la presentación de los resultados relativos a las condiciones ambientales registradas y que estarán ligados, y a su vez determinaran los niveles de emisión registrados (Blanes-Vidal *et al.*, 2008; Haeussermann *et al.*, 2006; Saha *et al.*, 2010).

En la Figura 5.4.2.1 se presenta la evolución en la temperatura y la humedad relativa registrada durante los meses de Febrero a Junio 2012, en los días que se realizó la prueba de cebo. En la Tabla 5.4.2.1 se presentan los valores medios del periodo de muestreo, y que se sitúan en el rango normal a los registrados en esta zona y estación. Si existe una relación directa entre condiciones ambientales (i.e. temperatura) y la emisión gaseosa, los niveles de aireación de la nave deben ser graduados en función de dicha relación para evitar que las concentraciones de ciertos gases (i.e. NH₃) en el alojamiento alcancen concentraciones limitantes o tóxicas (>50 ppm, Babot y Revuelta, 2009; Banhazi *et al.*, 2008). Por ello en la misma tabla se presentan los flujos medios de renovación de aire (n = 4 módulos). En la fosa, y para describir las condiciones físicas registradas durante el periodo de muestreo, se presentan también en la Tabla 5.4.2.1 los registros de pH, temperatura y profundidad o altura media del purín almacenado, así como los flujos medios de aire inducidos en las CFC alojadas

en el purín para determinar su emisión. Tal como se describió en apartado de Material y Métodos los flujos de renovación se realizaron siempre tras 7 días de almacenamiento de purín y tras 22 a 27 días de adaptación a las raciones experimentales.

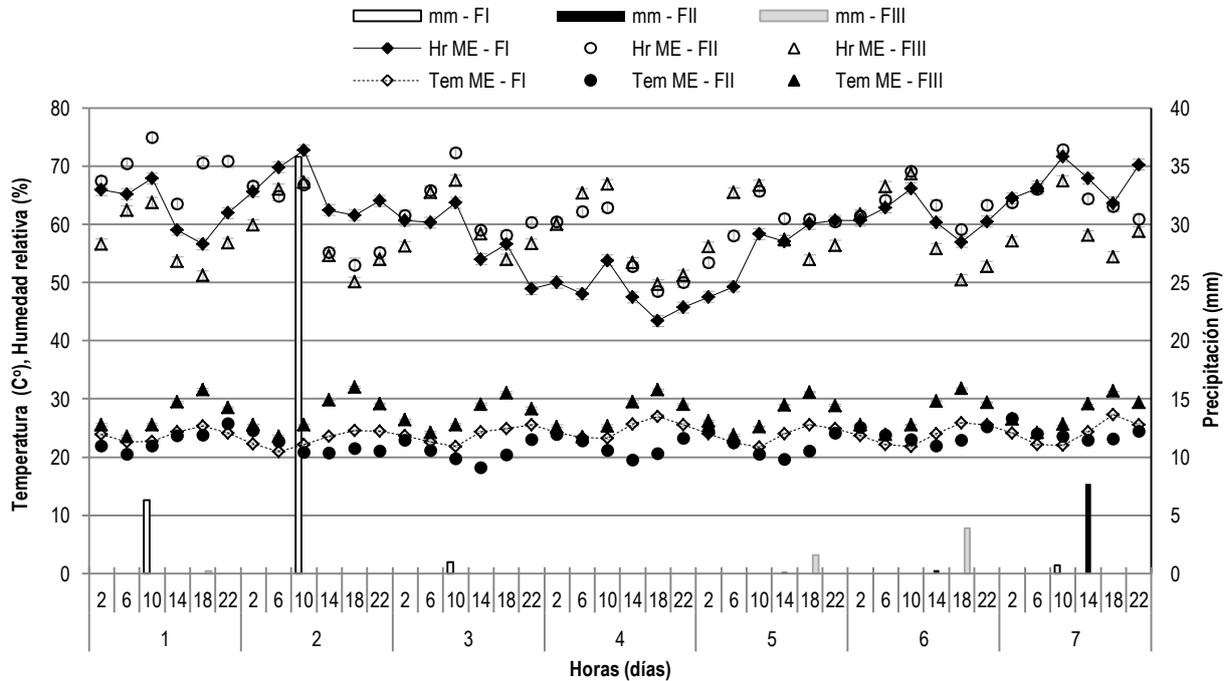


Figura 5.4.2.1. Evolución de la temperatura (°C) y humedad relativa (Hr, %) registrada en los Módulos Estanco [ME], junto con las precipitaciones registradas [trazos gruesos (mm)] en exterior de la nave durante la semana de muestreo de cada fase.

Tabla 5.4.2.1. Valores medios de las condiciones físico-químicas registradas en los módulos estancos y en fosas de deyecciones durante los periodos de muestreo.

Ítem	Fase I	d.e.	Fase II	d.e.	Fase III	d.e.
Módulos Estancos						
Temperatura ambiental (°C)	25,1	0,84	23,3	2,5	27,1	3,1
Humedad relativa ambiental (%)	50,3	8,2	60,9	8	58,9	17,8
Flujo de aire (m ³ an/h)	21,0	1,56	36,63	3,06	89,19	13,5
Fosa de deyecciones						
Temperatura del purín (°C)	19,01	0,9	20,6	1,7	23,5	1,1
pH	7,33	0,08	7,33	0,12	7,23	0,08
Altura inicial purín (cm)	12,5	2,7	18,6	6,5	17,2	2,8
Altura final purín (cm)	13,4	2,9	19,9	9,4	20,7	3,3
Flujo de aire en CFC (L/m ² /h)	35,2	0,5	34,8	0,6	35,8	0,3

La temperatura media registrada en los ME no difirió entre las dos primeras fases y ello fue así por la regulación térmica ejercida del sistema de calefacción del que dispone la nave, no obstante, en

la Fase III (mes de Junio), la temperatura ambiental del ME se elevó de forma considerable y ello fue así con independencia de la ventilación de la nave, ventilación que se incrementó de forma paulatina con la fase del cebo (21,0 d.e. 1,56; 36,63 d.e. 3,06 y 89,19 d.e. 13,15 m³ an/h para las Fases I, II y III, respectivamente). Con la modificación de los niveles ventilación se pretende regular las temperaturas diurnas en el interior de los módulos y diluir la concentración de los gases tóxicos producidos. En este sentido, cabe señalar que en ningún caso los incrementos en la ventilación redujeron la concentración por debajo de los umbrales de detección de las técnicas analíticas utilizadas. Con el crecimiento de los animales y la temperatura, se incrementó el consumo de agua, los intercambios hídricos y con ello la humedad ambiental de los módulos que incrementó del 50 al 59% (Fases I y III, respectivamente), los incrementos en la ventilación no modificaron dicho parámetro. En todos los casos la temperatura de la fosa fue inferior a la registrada en el ambiente ($\approx 1,6$ d.e. 0,8 °C) y aunque también incrementó, en este caso, lo hizo de forma más progresiva. No se detectaron modificaciones relevantes en los niveles de pH del purín, que fue constante y ligeramente alcalino (pH > 6,0: 7,3 d.e. 0,08; 7,3 d.e. 0,12 y 7,2 d.e. 0,08 para las Fases I, II y III, respectivamente). La aireación de las CFC estuvo inducida experimentalmente durante los muestreos y por tanto los niveles de renovación fueron constantes.

5.4.2.1. Emisión de metano: efecto del nivel de fibra y proteína de la ración.

La concentración de gas en los módulos estancos va a estar determinada por el equilibrio entre la emisión de un determinado gas, en este caso el CH₄, y su evacuación a través del proceso de ventilación. Es cierto, que los niveles de ventilación no variaron a lo largo del día o lo hicieron mínimamente, pero sí lo hicieron las concentraciones, con lo que podemos deducir que la emisión diaria de CH₄ no fue constante y estuvo sujeta a ritmos circadianos que procederemos a analizar a continuación. En principio cabe señalar que se registró una relación inversa entre los niveles de ventilación y la concentración media de CH₄ en los módulos estancos, disminuyendo con la fase del cebo y/o ritmos de ventilación, así los valores medios al tiempo de muestreo fueron de 5,2, 4,1 y 3,3 s.e. 0,90 mg/m³ ($P=0,3488$) para las Fases I, II y III, respectivamente. Estos valores no fueron modificados por los niveles de proteína de la ración ($P>0,05$), pero si lo fueron ligeramente por los niveles de fibra. Así las concentraciones de CH₄ fueron más elevadas en los módulos de los animales que ingirieron una mayor proporción de fibra digestible (FND). Estas diferencias fueron aparentes [Fases I (5,76 y 4,54 s.e. 1,35), Fase II (4,48 vs 3,66 s.e. 1,23) y III (3,95 y 2,72 s.e. 1,23)], nunca alcanzaron significación estadística ($P>0,05$).

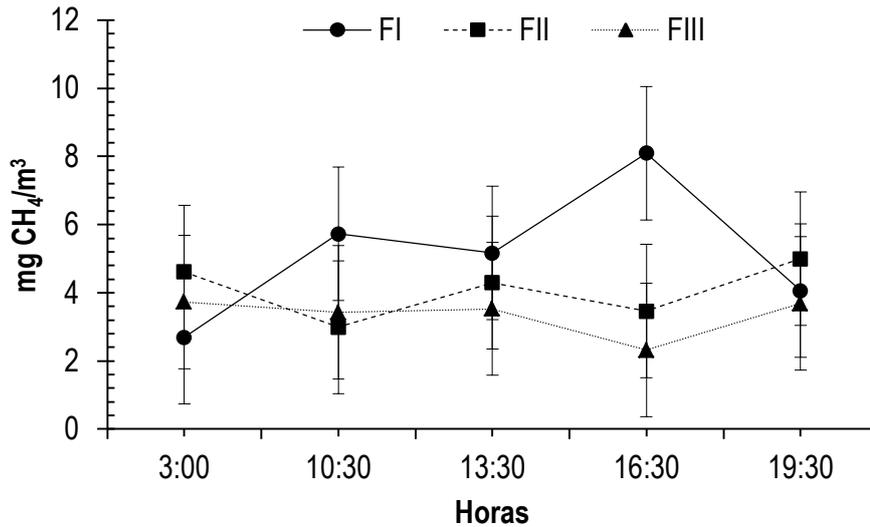


Figura 5.4.2.2. Evolución de la concentración diaria de CH₄ en módulos estancos, los valores corresponden a los valores medios obtenidos en cada fase del cebo.

En la Figura 5.4.2.2 se aprecia la escasa relevancia de los cambios en las concentraciones de CH₄ registradas a lo largo del día. La emisión de metano es básicamente de origen entérico (> 50%: Monteny *et al.*, 2004) y debería ser constante en la medida que lo es la fermentación ceco-colónica. Esta constancia en los niveles de fermentación reflejaría la estabilidad del flujo de nutrientes y la persistencia de los parámetros de fermentación registrados en los compartimentos de fermentación post-gástrica (Belenguer *et al.*, 2005). No obstante, la relación que se observa entre la concentración de CH₄ y los procesos de fermentación deben ser analizados con precaución, dado que dichos valores pueden estar distorsionados por dos factores: i) la presencia de un proceso de aireación, variable entre módulos y tiempos, y ii) por la presencia de CH₄ en el módulo precedente de la fermentación de las deyecciones.

A continuación se analizará la concentración de CH₄ originada en la fosa de deyecciones. La concentración de CH₄ en el aire drenado de la fosa de deyecciones fue muy superior a los niveles registrados en los módulos estancos e incrementó con la fase de cebo/edad de los animales. Las concentraciones de metano registradas fueron mínimas en la primera Fase (0,04 s.e. 0,13 g/m³), para incrementar ($P < 0,05$) paulatinamente con la fase de crecimiento (0,75 s.e. 0,096 y 3,12 s.e. 0,096 g/m³ en las Fases II y III, respectivamente).

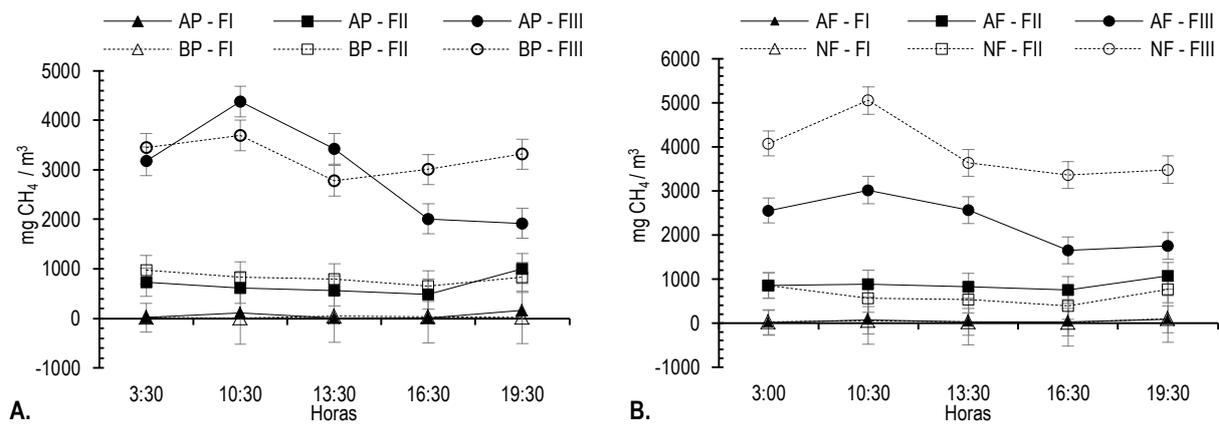


Figura 5.4.2.3. Evolución de la concentración diaria de CH₄ en fosa de deyecciones (A: efecto del nivel de proteína y B: efecto del nivel de fibra) registrada a diferentes tiempos de muestreo en las tres fases del engorde.

En ambas Figuras 5.4.2.3 (A y B) se aprecia gráficamente la relación positiva entre las concentraciones de metano en el aire drenado de la fosa y la edad/fase de engorde, siendo estas diferencias especialmente acusadas entre las Fases I y III. Por otra parte y cuando se detectan las mayores concentraciones (Fase III), estas no mostraron un perfil constante: se elevaron durante la madrugada y primeras horas del día para decrecer posteriormente durante la tarde-noche. Los autores de la presente memoria no han podido encontrar resultados con los que contrastar las variaciones circadianas registradas en las concentraciones de CH₄, no obstante, los cambios registrados debería reflejar variaciones en las condiciones de fermentación y flujos de nutrientes a lo largo del tracto digestivo, estas dos variables se abordaran en capítulos posteriores de la presente memoria.

En relación al tratamiento experimental, los niveles de proteína no parecen alterar de forma relevante las concentraciones de CH₄ en el aire drenado, pero sí el nivel de fibra de la ración, así los purines de aquellos animales que ingirieron una mayor proporción de fibra digestible (FND) mostraron mayores concentraciones de CH₄ en el aire evacuado en la Fase II, no obstante, estas diferencias no alcanzaron significación estadística hasta la fase final, donde la mayor concentración correspondió a fosas de cerdos que ingirieron menor nivel de fibra digestible. Las concentraciones medias (g/m³) registradas fueron de 0,04 vs 0,04 s.e. 0,177; 0,88 vs 0,62 s.e. 0,135 y 2,31 vs 3,92 s.e. 0,135 para las Fases I, II y III en los animales que recibieron, respectivamente, los mayores y menores niveles de fibra. En el caso de las concentraciones de CH₄ registradas en el aire drenado de las deyecciones, es necesario señalar que, sí el flujo de aire de renovación de las CFC fue inducido experimentalmente y este fue constante, por tanto las concentraciones deberían reflejar fielmente los niveles de emisión.

Los niveles de emisión de CH₄ calculados a partir de la concentración del gas y los flujos de renovación de aire de los módulos estancos y las CFC se analizarán a continuación. En la Tabla 5.4.2.2 se presenta la emisión total registrada en los módulos estancos en las tres fases de cebo, a los 33, 66 y 102 kg PV. No se apreciaron interacciones significativas entre los factores principales a estudio, por tanto los valores medios diarios registrados se expresan en función de los efectos principales.

Tabla 5.4.2.2. Emisión diaria de CH₄ en sala (módulos estancos: ME), en cerdos en cebo alimentados con raciones a dos niveles de proteína (PB: AP y BP) y dos de fibra digestible (FND: AF y NF) en un sistema de alimentación en tres fases, a los 33, 66 y 102 kg PV (Fases I, II y III).

Ítems	FI	FII	FIII	s.e.	AP	BP	s.e.	AF	NF	s.e.	Significación	
											Fase	FND
g CH₄/an	2,5 ^b	3,5 ^b	7,6 ^a	0,59	4,9	4,1	0,48	5,2 ^a	3,8 ^b	0,48	***	*
mg /kgPV^{0,75}	206 ^{ab}	166 ^b	245 ^a	22,0	217	195	18,1	234 ^a	177 ^b	18,1	*	*
g /kg MSI	1,9 ^{ab}	1,6 ^b	2,8 ^a	0,24	2,3	1,9	0,20	2,4	1,8	0,20	**	ns
mg /g FNDI	12,6 ^{ab}	9,4 ^b	16,7 ^a	1,42	14,3	11,4	1,16	13,1	12,7	1,16	**	ns
mg CH₄/g PBI	9,9 ^b	8,8 ^b	16,9 ^a	1,32	11,9	11,9	1,07	13,6 ^a	10,2 ^b	1,07	***	*

PB, proteína bruta (AP, alta proteína; BP, baja proteína); FND, fibra neutro detergente (AF, alta fibra; NF, normal fibra); FI-III, fase de crecimiento; s.e., error estándar de la media; PV^{0,75}, peso metabólico; MSI, materia seca ingerida; FNDI, fibra neutro detergente ingerida; PBI, proteína bruta ingerida.

^{ab} valores en la misma fila con superíndices distintos son diferentes ($P < 0,05$) en la fase, nivel de PB o nivel de FND. ns, $P > 0,05$; *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

La emisión total de CH₄ estimada en los módulos estancos, osciló entre los 2,23 y 8,83 g CH₄ an/d o expresados por kg de peso metabólico (mg/kg PV^{0,75}: 189,2 y 283,4). Contrastar los resultados obtenidos con aquellos descritos previamente no es una tarea fácil dada la variedad de condiciones experimentales y analíticas en las que dichos valores fueron obtenidos, no obstante, Zervas y Tsiplakou (2012) establecen un valor medio de 279, 455, 567 y 82,2 mg/kg PV^{0,75} para cerdos, vacas, pequeños rumiantes y aves, respectivamente. Esta variedad de información, con fines comparativos, se presenta resumida en la Tabla 5.4.2.4. Con independencia de las condiciones experimentales, los niveles diarios de emisión registrados (g CH₄ an/d) fueron similares al rango descrito por Christensen y Thorbek (1987): 1,4 - 9,2; Hansen *et al.* (2014): 3,6 y 4,11; Jørgensen (2007): 0,2 - 7,86; Osada *et al.* (1998): 4,78 - 5,39, superiores a los registrados por Ji *et al.* (2011): 1,13 - 2,01 o inferiores a los reportados por Atakora *et al.* (2011): 17 a 25,4 y Philippe *et al.* (2007a): 15,5. Desafortunadamente expresando las tasas de excreción en función del peso metabólico no se consiguió reducir de una forma consistente la variación existente, así las emisiones registradas (mg CH₄/kg PV^{0,75}) se situarían en unos valores que variarían entre los 134 y 283,4.

Las emisión total de CH₄ fue modificada por el tratamiento experimental, así los niveles medios de emisión de CH₄ se incrementaron con la fase de cebo (g an/d: 2,5, 3,5 y 7,6 s.e. 0,59 para las Fases I, II y III, respectivamente), aunque no de forma homogénea, los incrementos fueron aparentes entre las Fases I y II, y alcanzaron significación estadística ($P<0,05$) en relación a las diferencias registradas en la Fase III (acorde con Hansen *et al.*, 2014). Al expresar las emisiones por el peso del animal, los valores registrados (mg/kg PV^{0,75}) fueron de 206,4, 166,5 y 245 s.e. 22,04 para las Fase I, II y III, respectivamente, y los valores medios registrados sólo difirieron ($P<0,05$) entre las Fases II y III.

Los incrementos en la ingestión de fibra (FND) aumentaron la emisión diaria de CH₄ (g an/d), así los animales que ingirieron las raciones con una mayor concentración de FND emitieron más CH₄ en términos absolutos (g an/d: 5,2 vs 3,8 s.e. 0,48) o relativos al peso (mg CH₄/kg PV^{0,75}: 234,2 vs 177,7 s.e. 18,02 para AF y NF, respectivamente; $P<0,05$). Cuando los valores de emisión se expresaron por unidad de fibra digestible ingerida (mg CH₄/g FND ingerida) la emisión fue numéricamente mayor en los animales que ingirieron las raciones más ricas en fibra, sin embargo, las diferencias no alcanzaron significación estadística. Si se observó un efecto significativo ($P<0,05$) en dicho parámetro con la maduración del sistema digestivo [edad/fase] de los animales, aunque las diferencias sólo alcanzaron significación estadística entre las Fases II y III (las tasas de emisión fueron de 12,6, 9,4 y 17 mg/gFNDI para las Fases I, II y III, respectivamente). La ingestión de proteína en ningún caso modificó las tasas de emisión de metano (acorde con Hansen *et al.*, 2014; Le *et al.*, 2009), no obstante, el nivel de emisión (por unidad de PB ingerida) siempre fue superior en aquellos animales que ingirieron las mayores concentraciones de FND (13,6 y 10,2 mg/gPBI, para AF y NF, respectivamente).

A continuación se analizará la emisión de CH₄ procedente de las deyecciones. Dicha emisión se registró mediante las campanas de flujo constante (CFC, Apartado 4.1.1.3) que permitieron aislar la emisión de una fracción representativa de la superficie del purín en la fosa. En este caso, si se apreciaron interacciones entre los diferentes factores a estudio, concretamente entre los valores de emisión registrados en los animales que ingirieron las diferentes concentraciones de fibra-proteína y el efecto fase. Por ello los valores medios de emisión y tratamiento se presentan por cada una de las fases de cebo analizadas (Tabla 5.4.2.3).

La emisión de CH₄ a partir de las deyecciones expresada en valores absolutos (g CH₄ an/d) o relativa al peso (kg PV^{0,75}) varió entre los 0,02 a 1,57 g an/d y 1,6 a 50 mg CH₄/kg PV^{0,75}. En función del purín generado en volumen (g/m³) o peso de la MS (g CH₄/kgMS) los niveles registrados oscilaron entre los 0,3 a 15,2 g CH₄/m³ o 0,07 y 1,64 g/kgMS. Contrastar los valores obtenidos con valores previos publicados requiere conocer los procedimientos con los que dichas emisiones fueron

calculadas, en este sentido debemos distinguir dos sistemas, sistemas externos (SE) en los que las emisiones han sido determinadas en purín fresco, aislado en diferentes tipos de contenedores y sometido a procesos de fermentación bajo diferentes condiciones (i.e. temperatura, nivel de aireación: Aarnink y Verstegen, 2007; Blanes-Vidal *et al.*, 2008; Haeussermann *et al.*, 2006) y los que, como en nuestro caso, han sido determinados “*in situ*” (Zhang *et al.*, 2007). Son más relevantes desde el punto de vista de nuestra discusión, aquellos valores derivados de los procedimientos *in situ* y en las unidades más comunes en que dicho parámetro ha sido expresado (g/m³ de purín). En este caso el rango de valores obtenidos por Zhang *et al.* (2007) (de 0,3 a 30 g CH₄/m³) engloba los valores obtenidos en nuestro trabajo, aunque sus niveles de variación responden a mayores tiempos y temperaturas de almacenamiento del purín. Los valores obtenidos en sistemas externos son más variados, como lo son las condiciones en que han sido obtenidos. A partir de la literatura consultada los valores se moverían en un rango de (3,4 g CH₄/m³: Amon *et al.*, 2007 a los 41,9 g CH₄/m³: Moset *et al.*, 2009, 2010b) (0,98 a 1,1 g CH₄/kg MO: Cerisuelo *et al.*, 2012). Una revisión más detallada de los trabajos a los que hemos tenido acceso se presenta resumida en la Tabla 5.4.2.5.

Tabla 5.4.2.3. Emisión diaria de CH₄ originada a partir de las deyecciones (fosas), estimada a partir de la colocación de CFC en las fosas de cerdos en cebo alimentados con raciones a dos concentraciones de proteína (PB: AP y BP) y dos de fibra (FND: AF y NF) en un sistema de alimentación en tres fases, a los 33, 66 y 102 kg PV.

Ítems	Fase	Proteína (PB)		Fibra (FND)		s.e.	Nivel de significación				
		AP	BP	AF	NF		Fase	PB	FND	PB*Fase	FND*Fase
<i>mg</i> <i>CH₄</i> <i>an/d</i>	FI	141 ^y	19 ^z	36 ^z	125 ^y	83,9					
	FII	278 ^y	353 ^y	370 ^y	261 ^y		***	ns	**	ns	***
	FIII	1.252,0 ^x	1.293,0 ^x	976 ^{bx}	1.570,0 ^{ax}						
<i>mg/kg</i> <i>PV^{0,75}</i>	FI	11 ^y	1,6 ^z	2,9 ^z	10 ^y	2,82					
	FII	13 ^y	17 ^y	18 ^y	12 ^y		***	ns	**	*	***
	FIII	39 ^x	44 ^x	32 ^{b,x}	50 ^{a,x}						
<i>g/m³</i> <i>purín</i>	FI	1,86 ^y	0,33 ^y	1,10 ^z	1,09 ^y	0,875					
	FII	4,03 ^y	3,04 ^y	4,66 ^y	2,42 ^y		***	ns	ns	ns	**
	FIII	11,9 ^x	12,5 ^x	9,3 ^{bx}	15,2 ^{ax}						
<i>g/kg</i> <i>MS</i>	FI	0,50 ^{ay}	0,07 ^{bz}	0,18 ^y	0,45 ^y	0,09					
	FII	0,53 ^y	0,70 ^x	0,74 ^x	0,50 ^y		***	ns	**	**	***
	FIII	1,05 ^{bx}	1,42 ^{ay}	0,83 ^{bx}	1,64 ^{ax}						
<i>g/kg</i> <i>MO</i>	FI	0,62 ^{ay}	0,09 ^{bz}	0,14 ^y	0,57 ^y	0,10					
	FII	0,68 ^y	0,88 ^y	0,92 ^x	0,64 ^y		***	ns	***	**	***
	FIII	1,25 ^{bx}	1,82 ^{ax}	0,99 ^{bx}	2,08 ^{ax}						

PB, proteína bruta (AP, alta proteína; BP, baja proteína); FND, fibra neutro detergente (AF, alta fibra; NF, normal fibra); FI-III, fase de crecimiento; s.e., error estándar de la media; PV^{0,75}, peso metabólico; MS, materia seca; MO, materia orgánica. (a,b) valores en la misma fila con superíndices distintos son diferentes ($P < 0,05$) en nivel de PB o nivel de FND, y (x,y,z) en columnas indican diferencia entre fases. ns, $P > 0,05$; *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

La emisión de CH₄ originada en las deyecciones incrementó con la fase de crecimiento (6,7, 15,0 y 41,4 mg/kg PV^{0,75}, para las Fases I, II y III, respectivamente), aunque dicho incremento no fue homogéneo, así las diferencias registradas entre las Fases II y III alcanzaron siempre relevancia estadísticas ($P < 0,05$), mientras que la existencia de diferencias entre las Fases I y II estuvo condicionada tanto por el nivel de fibra (Interacción Fase x FND: $P < 0,05$) como por el de proteína (Interacción Fase x PB: $P < 0,05$). Es necesario señalar que el efecto de la fibra sobre la emisión de CH₄ fue de signo contrario a la excreción total y la emisión en fosa fue mayor en los purines procedentes de aquellos animales que habían consumido las raciones con una menor proporción de fibra digestible. En tanto, Cerisuelo *et al.* (2014) en purines de cerdos alimentados con pulpa de cítrico y/o algarrobo como fuentes de fibra no detectaron efecto sobre el potencial y la producción de CH₄. En relación a la emisión por unidad volumen de purín (g CH₄/m³) producido, esta incrementó con la fase de crecimiento y al igual que sucedía en el caso anterior, los incrementos registrados entre las Fases II y III alcanzaron significación estadística (3,5 vs 12,3 s.e. 0,62; $P < 0,05$), mientras que las diferencias entre las Fases I y II sólo alcanzaron significación estadística en aquellos purines procedentes de los cerdos que habían ingerido las raciones con mayores proporciones de fibra (Interacción Fase x FND; $P < 0,05$).

La fermentación de la materia orgánica del quilo en condiciones anaeróbicas produce un exceso de actividad reductora que es eliminada vía formación de CH₄ (Morgavi *et al.*, 2010), esta vía, mayoritaria en el rumen conlleva producciones de CH₄ elevadas (400 a 500 L/d/vaca adulta: Moss *et al.*, 2000; 38 L/d/oveja: Yáñez-Ruiz *et al.*, 2007). Este proceso también sucede en animales monogástricos, aunque en dichos compartimento coexisten otras vías de eliminación de dicha actividad (Belenguer *et al.*, 2011) y es menor, la emisión en cerdo se ha valorado entorno 0,1% a 1,3% de la ED ingerida (Jørgensen, 2007).

Nuestros resultados obtenidos en condiciones experimentales, que no difieren de las comerciales y que rigen el cebo de cerdo en nuestro país, confirman la existencia e importancia de dichas emisiones. La emisión media de CH₄ de un cerdo ingiriendo una ración “estándar” sería de $\approx 4,72$ g an/d con un mínimo de 2 g an/d en las últimas semanas del cebo (28 a 90 kg: Osada *et al.*, 1998). Nuestra cabaña porcina es de 24.597.154 y 2.271.338 (26.868.492) millones de cabezas en cebo y reproductores, respectivamente (MARM, 2013), y la emisión diaria de CH₄ se sitúa por tanto en las 142,83 Tm/d⁴ o 52.131,62 Tm anuales (en Eq. CO₂ $1,303 \times 10^{-3}$ Gg)⁵. De esta emisión media el 90,3% correspondería a la emisión entérica y el 9,7% a la emisión procedente de la fosa de deyecciones, la contribución máxima de las deyecciones se sitúa al final del cebo con un porcentaje del 17%.

⁴ Estimado a partir de resultados experimentales de engorde (estudio) y reproductoras (Medina *et al.*, 2013).

⁵ A partir de Solomon *et al.* (2007) [25 Eq.-CO₂ en un horizonte de 100 años].

La contribución de las deyecciones a la emisión de CH₄ es la más variable dada la variación que existe en las condiciones de manejo (tiempo de almacenamiento, temperatura, condiciones de la fosa, etc.). En cualquier caso al analizar los valores publicados referidos a la emisión de las deyecciones (Tabla 5.4.2.5) es necesario discriminar aquellos valores obtenidos en Sistemas Externos, optimizando condiciones de fermentación para obtener la máxima producción de metano. Estos niveles de emisión tienen que ser discriminados de los casos en los que dichos valores de emisión han sido obtenidos “*in situ*” y que pretenden reflejar una situación más real. En este sentido, la escasa relevancia de su contribución a la emisión total de CH₄ confirma la importancia de la emisión entérica, su constancia y la consistencia de nuestras estimaciones.

La administración de dietas ricas en fibra incrementó los niveles de emisión de CH₄, confirmando los resultados previos descritos en bibliografía (Jensen y Jørgensen 1994; Monteny *et al.*, 2001; Noblet y Shi, 1993). Con el desarrollo del animal incrementó la emisión de CH₄, respuesta acorde con trabajos de Ji *et al.* (2011), y ello fue así porque el animal incrementó los niveles de ingestión, pero también porque incremento la emisión por unidad de MS y FND ingeridas. Con el desarrollo del animal va a producirse una maduración de los compartimentos de fermentación, así como la flora simbiótica que permitirán una mejor fermentación del alimento especialmente de la fibra. Una relación temporal en la colonización del tracto digestivo por parte de las arqueas metanogénicas ha sido descrita previamente en bibliografía (Haussermann *et al.*, 2006).

No obstante, a partir de nuestros resultados resulta difícil justificar la relación inversa entre la proporción de FND de la ración y la emisión de CH₄ de sus correspondientes purines registrada al final del cebo (Fase III). Tampoco hemos podido validar esta respuesta contrastándola con resultados previos. La emisión de metano en la fosa se halla sujeta a multitud de factores, i.e. disponibilidad de oxígeno y sólidos volátiles, presencia de compuestos inhibidores, temperatura óptima para las arqueas (25 a 35 °C), y en su conjunto podían explicar los resultados obtenidos. Sin embargo, el hecho que las mayores emisiones en fosa se correspondan con las menores emisiones entéricas nos permite hipotetizar, con el hecho de, que la mayor fermentación entérica de la ración limite la probabilidad de una posterior fermentación residual durante el almacenamiento de las deyecciones.

No se registró ningún tipo de respuesta en la emisión de CH₄ al incrementar la proporción de PB de la ración, ello sugiere que las necesidades de proteína degradable utilizable por las bacterias intestinales fueron ya cubiertas con la ración basal, y por tanto al incrementar el nivel proteico de la ración no se logró ningún efecto sobre los patrones de fermentación ceco-colónica y consecuentemente sobre la emisión CH₄.

Tabla 5.4.2.4. Emisión de CH₄ (mg/kg PV o g an/d) obtenidos a partir de la bibliografía considerando los siguientes factores: métodos analíticos, nivel de proteína y fibra, tipo de suelo y temperatura. Emisión total (emisión entérica + fermentación de deyecciones).

Autor	Suelo [Emparrillado]	Procedimiento Analítico	PV (kg)	% PB	% FND	Temperatura °C	Q, m ³ /s	Emisión	
								mg/kg PV	g an/d
[1]	Yacija de paja. Removiendo el estiércol diariamente de la paja.	Espectro-fotometría	47,0-105 30,0-74,4 31,0-92,9 31,8-104 60,7-110 32,5-107			23,5 21,4 22,5 20,5 24,1 19,7		80,2 s.e. 14,3 45,4 s.e. 9,2 34,7 s.e. 17 22,5 s.e. 5,3 31,1 s.e. 11,5 21,7 s.e. 5,5	
[2]	Cámaras [†] Cámaras [‡]	Infrarrojos	55 s.e. 1,3	12, 16, 19,5 17,8 y 19,8	16,4, 22,6 y 24,1 23,1 y 25,4		240-250 L/min	23,9 y 25,4	17, 17,6 y 23,2
[3]	Parcial	Fotoacústico	86 a122			17,4 s.e. 0,5	0,36 s.e. 0,13	133,4 s.e. 45,1	
[4]	Cámaras	Cromatografía	58,7		20,1 y 33	21,5 s.e. 0,26	80-100 L/min		2,55 y 1,61 s.e. 0,3
[5]	Cámaras	Fotoacústico	25-120	16,5 y 18,3		18-22	6-6,5 m ³ /h		1,4 - 9,2
[6]	Total	Fotoacústico				18,7 (15-21)	2,19	410	
	Total					27 (25,9-27,7)	8,52	386	
	Total					27,5 (23-33,5)	7,75	336	
[7]	Parcial	Cromatografía	42-90			14-25	Natural	64,2 s.e. 23,4	
[8]	Cámaras		85 a 160	15; 14,7; 15; 14,6	13,5; 18,4; 17,7; 17,2	20			3,8; 3,2; 2,7; 5,6
[9]	Cámaras	Cromatografía	59 y 89,4	17 a 16,1	18 a 16,2	23,7 s.e. 3,74	15 L/min		1,13 y 2,01
[10]	Cámaras		28-94		2,8-40	20			0,2-7,86
[11]	Compilación		25-152		0,26-45	20			0,18 a 7,92
[12]	Total	Cromatografía	24,7-113			14,9-30,6		72,4 s.e. 4	
	Total		23,9-106			15,2-30,4		57,6 s.e. 3,6	
[13]	Parcial	Fotoacústico	31,9-87,1			16,4 y 16,6			4,78-5,39
[14]	Total	Fotoacústico	23,4-110	18,1 a 15,6		20,5 s.e. 1,0	70,1 s.e. 22,1		15,2 s.e. 2,58
[15]	Total	Fotoacústico	55,5-102	13,6 y 15,9		21	0,63 y 0,57		4,11 y 3,6

†: Alimentación a base de cebada,

‡: Alimentación a base de trigo,

[1] Amon *et al.*, 2007; [2] Atakora *et al.*, 2011; [3] Blanes-Vidal *et al.*, 2008; [4] Cao *et al.*, 2013; [5] Christensen y Thorbek, 1987; [6] Costa y Guarino, 2009; [7] Dong *et al.*, 2007; [8] Galassi *et al.*, 2004; [9] Ji *et al.*, 2011; [10] Jørgensen, 2007; [11] Jørgensen *et al.*, 2011; [12] Ni *et al.*, 2008; [13] Osada *et al.*, 1998; [14] Philippe *et al.*, 2007a; [15] Hansen *et al.*, 2014

Tabla 5.4.2.5. Emisión de CH₄ (g/m³) obtenidos a partir de la bibliografía considerando los siguientes factores: métodos analíticos, nivel de proteína, tipo de alojamiento y temperatura. Emisión a partir de la fermentación de deyecciones.

Referencia	Alojamiento	Procedimiento Analítico	kg PV	% PB	Temperatura °C	Q, m ³ /s	Emisión g/m ³
Amon <i>et al.</i> (2004)	Tanque	Espectroscopia		19 a 18	0 a 12	0,05 a 0,51	1,48
Amon <i>et al.</i> (2005)							4,1 [†]
Amon <i>et al.</i> (2007)	Balsa				16,4 y 17,9	0,37	3,4 y 5
Blanes-Vidal <i>et al.</i> (2008)	Bidón (7 días)	Fotoacústico	86 a122		18,2	1,85 L/min	6,23 s.e. 1,4
Cerisuelo <i>et al.</i> (2012)	Bidón	Fotoacústico	103,3±3,2		20	2,1-2,9 L/min	0,98 – 1,1 [‡]
Clark <i>et al.</i> (2005)	Bidón	Cromatografía	50 a 85	13,9-18,6		2 L/min	42
Loyon <i>et al.</i> (2006)	Bidón	Cromatografía					0,88 a 2,68
Moset (2009)	Bidón	Fotoacústico	21 a fin	15,1	23,9 s.e. 1,85	0,3 a 1,03 m ³ /h	41,9 s.e. 0,86
Moset <i>et al.</i> (2010b)	Bidón						4,8 a 12 [†]
Massé <i>et al.</i> (2003)	Bidón	Cromatografía			15		17,4 s.e. 3,3 a 19,6 s.e. 11
	Bidón				10		3,5 s.e. 1,8 a 8,66 s.e. 4,9
Zhang <i>et al.</i> (2007)	Fosa	Cromatografía	500		8 a 32	0,3	0,3 s.e. 0,5 a 30 s.e. 25

[†], Unidad de emisión expresada en g/m²

[‡], Unidad de emisión expresada en g/kg MO, calculada asumiendo una temperatura de 20°C y 1 atmósfera de presión.

5.4.2.2. Emisión de amoníaco: efecto del nivel de fibra y proteína de la ración.

Siguiendo un esquema similar al que se ha seguido en la emisión de metano, se analizará de forma previa a la emisión, las variaciones en la concentración media de NH_3 detectada (mg/m^3) en el aire de los módulos estancos y el evacuado de la CFC. En relación a las concentraciones medias registradas en los módulos estancos se apreciaron variaciones relacionadas con la fase de crecimiento (Fases I, II y III: 3,8, 6,1 y 4,8 s.e. 0,64 mg/m^3), aunque sólo los valores registrados en la Fase II difirieron ($P=0,07$) aparentemente a los registrados en la Fase I. En este sentido reiterar el escaso valor de dichas determinaciones dado que los valores de concentración registrados siempre van a estar distorsionados por el nivel de renovación de aire, cuyo perfil y evolución se discutieron en el apartado [5.4.2]. En cualquier caso señalar que el sistema de renovación de aire impidió que las concentraciones de NH_3 alcanzasen el valor tóxico determinado para este gas (> 15 ppm y 50 ppm como máximo aceptable y tóxico, Babot y Revuelta, 2009; Banhazi *et al.*, 2008).

Las concentraciones de NH_3 en los ME sí estuvieron relacionadas con el nivel de proteína de la ración, de forma aparente, así las concentraciones más elevadas se detectaron en los módulos que alojaron los animales que recibieron las raciones con una mayor concentración de proteína (5,3 y 4,5 s.e. 0,52 mg/m^3 para AP y BP, respectivamente). De esta forma en la Figura 5.4.2.4 se presentan las concentraciones medias diarias de NH_3 registradas en los módulos que alojaron los animales que recibieron las raciones con mayores (A) y menores niveles (B) de PB en las tres fases de crecimiento.

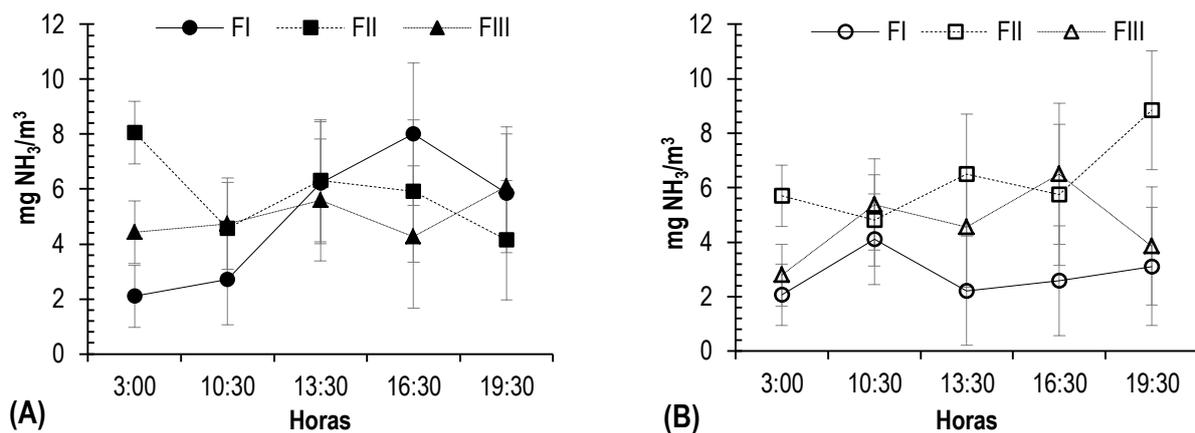


Figura 5.4.2.4. Evolución de la concentración diaria de NH_3 en los módulos estancos de los animales que recibieron las mayores (A: 19,7; 17,3 y 17,5%) y menores (B: 17,2; 15,1 y 12,5%) niveles de proteína (PB) en la ración y que corresponden a las tres fases de engorde o pesos vivos objeto del presente estudio.

Tal como se aprecia en la Figura 5.4.2.4 los datos registrados si muestran una variación circadiana en los niveles de contaminación por amoníaco del aire, especialmente en los cerdos que recibieron las raciones con un mayor contenido en proteína. Si asumimos que el nivel de renovación diario de aire fue constante se detecta una mayor emisión durante el día, bien por una mayor actividad metabólica de los animales durante la vigilia o bien porque se produjo, durante estas horas, un aumento de la temperatura que pudo favorecer la evaporación y la concentración de amoníaco. Este punto puede ser confirmado a partir de los datos que se muestran en la Figura 5.4.2.1, en los que se presentan las temperaturas y sus oscilaciones diarias en los módulos en los que la temperatura fue controlada. En ningún caso se apreció un efecto definido del nivel de fibra sobre la concentración de NH_3 .

En la Figura 5.4.2.5 se muestra la evolución circadiana de la concentración de NH_3 del aire evacuado del espacio de cabeza de las CFC. La concentración media de NH_3 estuvo ligada a los bajos ritmos de renovación del aire ($35 \text{ L/m}^2/\text{h}$) y la contaminación amoníacal media del aire evacuado de las CFC ($24,8$ y $26,5$ s.e. $5,02 \text{ mg/m}^3$ para AP y BP) fue muy superior a los valores registrados en los módulos ($5,3$ y $4,5$ s.e. $0,52 \text{ mg/m}^3$ para AP y BP). En ningún caso dichas concentraciones fueron modificadas de forma significativa por el tratamiento experimental, aunque si se observaron ciertas variaciones a lo largo del día, de menor relevancia y más irregulares que las registradas en los módulos, pero con su misma tendencia.

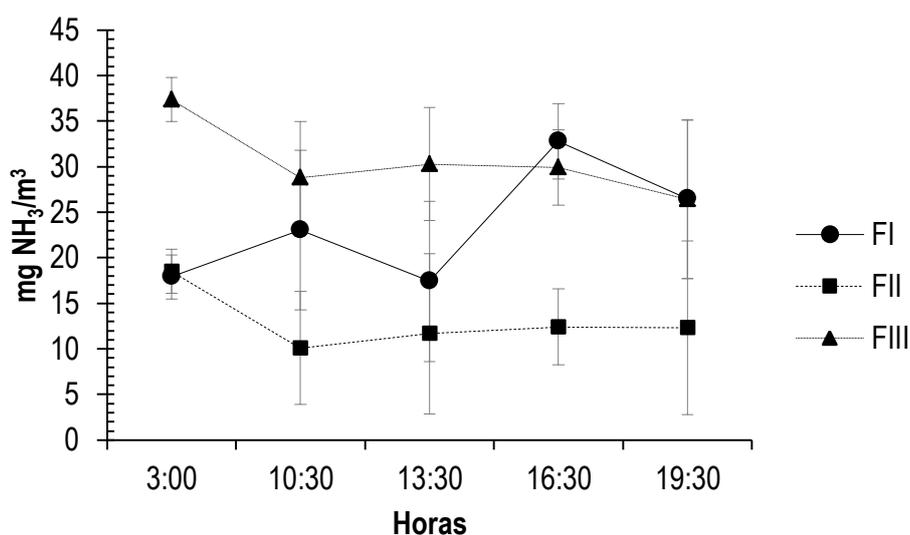


Figura 5.4.2.5. Evolución de la concentración diaria de NH_3 en el aire evacuado de la fosa de deyecciones. Los valores corresponden a las medias registradas en cada fase.

En las condiciones de alimentación y manejo detalladas en el apartado 4.4.2.3 de material y métodos, se detallan y analizan los niveles de emisión de NH₃ registrados en los módulos (procedente de los animales y su entorno) y de las CFC (procedente de las deyecciones), dichas emisiones fueron evaluadas a tiempos discretos de su fase de crecimiento o cebo.

Tabla 5.4.2.6. Emisión diaria de NH₃ en sala (módulos estancos), en cerdos en cebo alimentados con raciones a dos concentraciones de proteína (PB: AP y BP) y dos de fibra (FND: AF y NF) en un sistema de alimentación en tres fases, a los 33, 66 y 102 kg PV (Fases I, II y III).

Ítems	Fase de Crecimiento			s.e.	Nivel PB		Nivel FND		s.e.	Significación		
	FI	FII	FIII		AP	BP	AF	NF		Fase	PB	FND
	g/an	1,8 ^z	4,8 ^y		8,5 ^x	0,38	6,3 ^a	3,8 ^b		5,3	4,8	0,31
mg/kgPV^{0,75}	127 ^y	209 ^x	262 ^x	16,5	243 ^a	156 ^b	215	185	13,5	***	***	ns
g/kg MSI	1,4 ^z	2,2 ^y	3,2 ^x	0,18	2,8 ^a	1,8 ^b	2,5 ^a	2,1 ^b	0,15	***	***	*
mg/g PBI	6,4 ^z	12,1 ^y	19,1 ^x	0,98	13,8 ^a	11,2 ^b	13,7	11,3	0,80	***	*	ns
mg/g PBDI	7,6 ^z	14,6 ^y	23,3 ^x	1,18	16,6	13,7	16,8 ^a	13,6 ^b	0,97	***	ns ¹	*
mg/g FNDI	8,9 ^z	13,1 ^y	19,4 ^x	1,07	17,0 ^a	10,6 ^b	13,6	14,0	0,87	***	**	ns

PB, proteína bruta (AP, alta proteína; BP, baja proteína); FND, fibra neutro detergente (AF, alta fibra; NF, normal fibra); F_{I-III}, fase de crecimiento; s.e., error estándar de la media; PV^{0,75}, peso metabólico; MSI, materia seca ingerida; PBI, proteína bruta ingerida; PBDI, proteína bruta digestible; FNDI, fibra neutro detergente ingerida.

Valores en las misma fila con superíndices distintos son diferentes ($P < 0,05$) en la fase (^{xyz}), nivel de PB o nivel de FND (^{ab}). ns, $P > 0,05$; *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; *** $P < 0,001$. 1: $P = 0,059$

La emisión de NH₃ en las fases analizadas osciló entre los 1,19 y 10,44 g NH₃ an/d o referido al peso metabólico entre los 89,5 y 325,4 mg NH₃/kg PV^{0,75} y dicha emisión fue modificada de forma significativa por el tratamiento experimental. No se apreciaron interacciones entre los tratamientos a estudio, por lo que únicamente en la Tabla 5.4.2.6 se presentan los valores correspondientes a los efectos principales, con una excepción, las diferencias entre fases cuando la emisión fue expresada en g NH₃ an/d fueron más pronunciadas en la Fase III que en las Fases I y II, y ello dio lugar a una interacción significativa entre el efecto Fase III y el nivel de proteína (Interacción Fase x PB: $P < 0,05$), no obstante, cuando dicha emisión se corrigió por el peso del animal (PV^{0,75}) la citada interacción desapareció.

La emisión de NH₃ (g an/d) incrementó con la fase de crecimiento (1,8, 4,8 y 8,5 para las Fases I, II y III, respectivamente), dicho incremento se mantuvo al expresar la emisión por kg PV^{0,75} (127,5, 209,5 y 262,6 para las Fases I, II y III, respectivamente), aunque en este caso las diferencias sólo alcanzaron significación estadística entre la Fase I vs Fases II y III. La emisión de NH₃ estuvo también determinada con el nivel de proteína de la ración, los mayores niveles de ingestión de PB se reflejaron en una mayor emisión de NH₃, y ello fue así con independencia de la fase de cebo y forma de

expresión, en g an/d: 6,3 vs 3,8 s.e. 0,31 o corregida por el peso del animal mg/kg PV^{0,75}: 243,2 vs 156,5 s.e. 13,5). La bibliografía consultada referente a las emisiones de NH₃ es amplia y sujeta a las condiciones de alojamiento de los animales, por ello se ha realizado un esfuerzo de síntesis y así poder comparar de forma coherente los resultados obtenidos, considerando como referencia teórica los datos propuestos por el BREF (European Commission, 2003). A partir de los cuales y en animales de más de 30 kg PV, con suelos enrejados parcialmente y temperaturas variables los niveles de emisión medios deben de situarse entre los 2,46 y 6,57 g an/d (Tabla 5.4.2.8), rangos que coincidirían con los valores medios registrados en las Fases II y III (4,8 y 8,5 g an/d). No obstante, en condiciones de producción similares podemos encontrar autores que obtienen emisiones inferiores (Osada *et al.*, 1998; Philippe *et al.*, 2007a) o superiores (Fernández *et al.*, 1999). Niveles de emisión que serán más variables al incrementar el rango de peso de los animales experimentales (Sun *et al.*, 2010) e incrementaran al considerar valores derivados de unidades experimentales provistas de suelos sin emparrillar (European Commission, 2003; Sun *et al.*, 2010). Por ello, en la Tabla 5.4.2.8 se presenta una descripción comparativa de las condiciones ambientales y los registros de emisión registrados.

En cualquier caso, en nuestras condiciones experimentales, que no diferirían de las condiciones de producción comercial, la producción media de NH₃ se situaría en torno a los 4,8 g an/d y un máximo de 8,5 g an/d al final del cebo. A partir de estos datos la emisión total de nuestra cabaña de animales en cebo sería de 145,19 Tm/d o 52.992,9 Tm/año.

Con la fase de crecimiento la emisión de NH₃ (g an/d) incrementó (1,8, 4,8 y 8,5 para las Fases I, II y III, respectivamente) y dicho incrementó se mantuvo, aunque más moderado al expresar la emisión por kg PV^{0,75} (127,5, 209,5 y 262,6 para las Fases I, II y III, respectivamente). Reflejando el manejo convencional se procedió a una alimentación por fases, reduciendo el contenido en PB de la ración (de 2,5, 2,2 y 5% para las Fases I, II y III, respectivamente) para lograr un óptimo ajuste entre necesidades y aportes, lo que ha demostrado ser efectivo para reducir substancialmente el N excretado y NH₃ emitido (Dourmad y Jondreville, 2007; Rademacher, 2000), no obstante, la emisión siguió incrementando con el desarrollo de los animales, es probable que las raciones empleadas admitan posteriores reducciones en el contenido de PB si se combina con un óptimo ajuste del aporte de AA en la ración sin afectar de forma negativa a las producciones (Dourmad *et al.*, 1993).

Para la presente discusión podemos considerar que debe existir una relación directa entre excreción de N, básicamente urinario, y la emisión de NH₃ (Laubach *et al.*, 2013; Ocepek y Škorjanc, 2013). El origen del N urinario es diverso, pero podemos distinguir dos orígenes mayoritarios, en primer lugar las pérdidas irreversibles resultantes de la renovación endógena de los tejidos y una

fracción más variable procedente de la ineficiencia en la utilización de los AA absorbidos. Las pérdidas endógenas de AA pueden ser modificadas por la cantidad diaria de alimento ingerido, sin embargo, el nivel de excreción no varía al expresarlo en g/kg MS ingerida (Cervantes-Ramírez *et al.*, 2001), Aunque dichas pérdidas en el animal no son constantes (Leterme, 2002), el efecto del peso corporal sobre la pérdida expresada por kg de MSi disminuye cuando aumenta el peso del cerdo, mientras que cuando se expresa por día, aumenta de manera lineal (Leterme, 2001). Considerando que las pérdidas endógenas constituyen una fracción minoritaria y que no habría razones teóricas que explicasen un aumento en dichas pérdidas con el desarrollo del animal, el incremento en la emisión de NH₃ registrada con la edad nos permite considerar que aún existe margen en la elaboración de las raciones que permita reducir las pérdidas urinarias y por ende los niveles de emisión de NH₃.

Con el desarrollo del animal el consumo N se redujo (2,79, 2,56 y 2,06 g N/kg PV^{0,75} en FI, II y III, respectivamente) y con ello la emisión de NH₃, expresada por g de PB ingerida incrementó (6,4, 12,1 y 19,1 mg NH₃/gPB, $P < 0,05$; para las Fases I, II III, respectivamente). Esta expresión nos permite calcular las pérdidas irreversibles de N (NH₃) que incrementaron con la edad, entre el 4,0 y el 11,9% del N ingerido, datos que confirman resultados obtenidos por Hansen *et al.* (2014): 10%; Philippe *et al.* (2007a): 8,6%; y Groenestein y Van Faassen (1996): 12%.

Resultados previos han demostrado la relación negativa entre ingestión de PB y emisión de NH₃ (Canh *et al.*, 1998a-d; Le *et al.*, 2008ab; Zervas y Zijlstra, 2002), nuestros resultados avalarían dicha relación y por cada unidad porcentual que excedió al nivel de proteína utilizado en la ración control la emisión de amoníaco incrementó entre el 15 y 37%. El incremento en la emisión de NH₃ se evidenció también cuando los resultados se expresaron por unidad de PB ingerida. En este sentido diversos trabajos (Canh *et al.*, 1998a-d; Kay y Lee, 1997; y Latimier y Dourmad, 1993) demostraron que los incrementos en los niveles de emisión de NH₃ por unidad de PB dietética, variaron entre el 3,2 y el 12,5%.

Las pérdidas urinarias de N y la emisión de NH₃ pueden reducirse vehiculando una fracción de la urea plasmática al intestino grueso. Esto es, el incrementar la actividad bacteriana en el colon mediante la adición dietética de fibra fermentable (FND), se permite fijar N no proteico plasmático y con ello reducir su excreción renal. Existen varias referencias en las que se ha demostrado un incremento en la excreción fecal de N en detrimento de las pérdidas urinarias cuando se administraron diferentes tipos de fibra fermentable (Bakker, 1996) y dicha reducción fue cuantificada por Kreuzer y Machmüller (1993), quienes cifraron que por cada incremento porcentual de hidratos de carbono no amiláceos la excreción renal de N se reducía entre el 0,9 y 1,4%, y con ello la consiguiente emisión de NH₃.

No obstante, en nuestro caso y en relación a los niveles de FND de la ración, no se pudieron detectar diferencias significativas ($P>0,05$) en la emisión de NH_3 relacionadas con la ingestión de fibra fermentable cuando estas se expresaron en g an/d (5,3 vs 4,8 s.e. 0,31), mg/kg $\text{PV}^{0,75}$ (215 vs 184,7 s.e. 13,5) o mg/gFND ingerida (13,6 vs 14,0 s.e. 0,87 para AF y NF, respectivamente). El reciclaje de N plasmático a través del intestino grueso se produce cuando existe un déficit de N degradable en el compartimento de fermentación, este valor deficitario en el rumen se ha cifrado alrededor de 5 mg $\text{NH}_3/100$ ml de contenido ruminal (Satter y Slyter, 1974) y se considera que esta concentración debe ser menor en los compartimentos de fermentación post-gástricos (Belenguer *et al.*, 2005), aunque no se ha establecido un valor umbral. En cualquier caso, y dadas las concentraciones colónicas de NH_3 detectadas en aquellos animales que recibieron las raciones con una mayor disponibilidad de MO fermentable y menor de N (cerdos que recibieron las raciones <PB y >FND) (13,1 y 10,7 mg $\text{NH}_3/100$ g contenido colónico, para BP y AF, respectivamente), las concentraciones de N- NH_3 registradas parecen descartar la posibilidad de este posible trasvase de N plasma-tracto ceco-colónico. El hecho, comentado en el apartado anterior, referente a la ausencia de efecto del nivel de proteína de la ración sobre la emisión de CH_4 podría confirmar este efecto dado que al incrementar la fermentación microbiana en el intestino grueso lo haría también la concentración de AGV y la emisión de CH_4 (Jørgensen, 2007).

La emisión de NH_3 registrada con las CFC representa las emisiones procedentes de la fosa de deyecciones y su medida nos permite diferenciar aquellas emisiones relacionadas con el animal (o su alojamiento) y la procedente del almacenamiento de las deyecciones, sujetas como se comentó en capítulos anteriores a unas determinadas condiciones de almacenamiento. Los niveles medios de emisión de NH_3 procedente de la fosa de deyecciones (14,9 mg an/d) representaron una mínima fracción de la emisión total (10,1 g an/d), y constituyó según la fase de crecimiento en los siguientes porcentajes: 1,21, 0,17 y 0,18% de la emisión total en las Fases I, II y III, respectivamente, por tanto los niveles de emisión fueron irrelevantes y mínimamente afectadas por el tratamiento experimental. Esto es, la ingestión de diferentes niveles de proteína o fibra no alteraron la emisión de NH_3 en el purín (Tabla 5.4.2.7; $P_s>0,05$), aunque si se apreciaron ciertas modificaciones de escasa relevancia relacionadas con la edad o el desarrollo de los animales ($P<0,05$).

El efecto fase se tradujo en una reducción en la emisión de NH_3 , cuando dicha emisión se expresó en función del peso vivo de los animales (mg/kg $\text{PV}^{0,75}$) o de signo contrario, incrementó significativamente cuando se expresó en función de los constituyentes del purín (m^3 , kg MS, gMO o N; Tabla 5.4.2.7). Sin duda este cambio en la evolución de los resultados puede indicar que las

variaciones en el peso registrado en los animales experimentales no fueron proporcionales al incremento en la producción de purín.

Tabla 5.4.2.7. Emisión diaria de NH₃ del espacio de cabeza de las CFC (deyecciones) de las fosas donde se alojaban cerdos en cebo alimentados con raciones a dos concentraciones de proteína (PB: AP y BP) y dos de fibra fermentable (FND: AF y NF) en un sistema de alimentación en tres fases, a los 33, 66 y 102 kg PV (Fases I, II y III). Los valores de emisión se presentan expresados en función de los animales o el purín almacenados.

Ítem	Fase de Crecimiento			s.e.	Nivel PB		Nivel FND		s.e.	Significación		
	FI	FII	FIII		AP	BP	AF	NF		Fase	PB	FND
Animal												
mg an/d	21,3	8,3	15,2	4,00	14,9	14,9	10,5	19,3	5,66	ns	ns	ns
mg/kg PV ^{0,75}	1,5 ^x	0,4 ^y	0,5 ^y	0,26	0,8	0,8	0,5	1,1	0,26	*	ns	ns
Purín												
mg/m ³	333 ^x	78 ^y	145 ^{xy}	65,6	178	193	146	225	92,8	*	ns	ns
mg/gMS	0,07 ^x	0,02 ^y	0,02 ^y	0,011	0,04	0,03	0,02	0,05	0,015	**	ns	ns
mg/gMO	0,09 ^x	0,02 ^y	0,02 ^y	0,014	0,05	0,04	0,03	0,06	0,019	**	ns	ns
mg/gN	0,09 ^x	0,02 ^y	0,03 ^y	0,014	0,05	0,04	0,03	0,06	0,020	*	ns	ns
mg/gN-NH ₄	0,16 ^x	0,04 ^y	0,05 ^y	0,027	0,09	0,08	0,05	0,11	0,038	*	ns	ns
mg/g N-Org	0,24 ^x	0,05 ^y	0,06 ^y	0,03	0,12	0,12	0,09	0,15	0,049	**	ns	ns

PB, proteína bruta (AP, alta proteína; BP, baja proteína); FND, fibra neutro detergente (AF, alta fibra; NF, normal fibra); FI-III, fase de crecimiento; s.e., error estándar de la media; an/d, animal y día; PV^{0,75}, peso metabólico; y referente a composición del purín: MS, materia seca; MO, materia orgánica; N, nitrógeno total; N-NH₄, nitrógeno amoniacal; N-Org, nitrógeno orgánico.

Valores en las misma fila con superíndices distintos (^{xy}) son diferentes ($P < 0,05$) en la fase.

ns, $P > 0,05$; *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$.

Existe una relación directa entre el nivel de aireación de una fosa y el nivel de producción de amoníaco, dadas las condiciones de aerobiosis que el proceso de amonificación requiere (Espagnol *et al.*, 2008), sin embargo, el efecto contrario se ha detectado en la síntesis de metano y su relación inversa con la anaerobiosis. Por tanto, al decidir el caudal de renovación experimental del aire de cabeza de las CFC se buscó una solución de compromiso y se utilizó un nivel de renovación de aire de 35 L/m²/h. El ritmo de renovación utilizado no pareció alterar la producción de CH₄, pero sí lo hizo con la emisión de amoníaco, cuyos valores fueron en general bajos.

Los niveles de emisión registrados (g/m³: 0,07 a 0,3) aunque se situaron en el rango descrito por Amon *et al.* (2004); cuyos registros variaron entre 0 y 2 g/m³, cuando se expresaron en g/m² (0,01-0,2) los valores fueron inferiores a los trabajos previos, pero de naturaleza similar en los que se utilizaron CFC flotantes sobre el purín (0,69 a 3,11: Blanes-Vidal *et al.*, 2008; Le *et al.*, 2008ab; Zhang *et al.*,

2007), citar en este caso que los niveles de aireación fueron siempre superiores a los 0,5 L/min (Tabla 5.4.2.9).

Tal como fue detallado en el apartado de revisión, distinguimos dos procesos de amonificación o síntesis de NH_3 . El primer proceso, el más rápido y mayoritario donde la urea y el ácido úrico son degradados por dos enzimas específicas, que son la ureasa y la uricasa, ambas enzimas son ubicuos, de origen microbiano (bacteriano en su mayor parte, 90%) y su actividad máxima se desarrolla en aerobiosis a pH alcalino y con un rango térmico muy amplio (de 10 a 50 °C: Sommer *et al.*, 2006). El segundo proceso de amonificación, menos conocido, es el que sufre el N orgánico fecal y cuyos ritmos son mucho más complejos y lentos de ejecución. El primer mecanismo de amonificación se activará donde se conjuguen aquellos factores predisponentes, es decir las superficies de contacto entre orina y ambiente, y esta fracción se cuantificará mayoritariamente en la emisión en sala. Todos aquellos factores que incrementen la cantidad de orina, urea urinaria y/o optimice las condiciones enzimáticas que incrementarán la emisión de NH_3 en el emparrillado, piso y paredes (i.e. cantidad de PB ingerida, peso de los animales, etc.).

No todo el proceso de degradación de la urea (i.e. amonificación) va a dar lugar a amoníaco, una fracción importante y variable será transformada a ion amonio (NH_4^+), que se mantendrá en disolución y en un equilibrio dinámico con el NH_3 , este equilibrio esta modulado por dos factores, la temperatura y la acidez del medio (Hansen *et al.*, 2007; Saha *et al.*, 2010). El reservorio de NH_4^+ es la fosa de deyecciones, y ahí las concentraciones de NH_4^+ registradas fueron elevadas y variaron entre 33,9 y 78,1 g/kgMS. Probablemente la fosa actúe también de reservorio para la mayor parte del N-orgánico, cuyas concentraciones fueron de 28,8 y 46,9 g/kgMS y cuya generación de NH_3 se ha demostrado que es más paulatina y de menor relevancia si consideramos además que el tiempo medio de almacenamiento de purín en las fosas fue de 7 a 10 días. Si la temperatura de la fosa es estable el equilibrio entre NH_4^+ y NH_3 depende del pH en el medio. El purín es un ecosistema microbiano alimentado por los residuos orgánicos del alimento y las excretas, y cuya población debe estar relacionada con la población fecal.

El pH de este ecosistema depende de las concentraciones de los catabolitos de fermentación, así las elevadas concentraciones de NH_3 alcalinizan el medio e incrementan la síntesis de amoníaco, mientras que niveles elevados de fermentación incrementan la producción de AGV, acidificando el medio y manteniendo elevadas las concentraciones de la forma ionizada (NH_4^+).

La escasa emisión registrada a partir de la fosa, el pH y las elevadas concentraciones de NH_4^+ en el purín parecen sugerir una elevada estabilidad del N amoniacal en la fosa, lo que confirmaría su escasa contribución a la emisión total. La inclusión experimental de FND debería constituir una fuente de energía adicional para el ecosistema del purín lo que debería incrementar la producción de AGV, reducir el pH y reducir aún más la emisión de NH_3 (Aarnink y Verstegen, 2007; Dourmad y Jondreville, 2007), pero estaría modulada por la fuente de fibra, así estudios de Cerisuelo *et al.* (2014) muestran tendencia hacia una menor emisión de NH_3 en purín cuando los cerdos son alimentados con pulpa de cítrico, respuesta que no detectaron al utilizar el algarrobo como fuente de fibra. No pudimos detectar esta respuesta y ello podría estar justificado por una persistencia de un pH no lo suficientemente ácido para estabilizar la forma ionizada (NH_4^+) o que los AGV producidos sean posteriormente metabolizados hasta la formación final de CO_2 y CH_4 , y no contribuyan a la acidez del medio. Incrementando el aporte de fibra a los animales no pudimos alterar el sistema, ni obtuvimos ninguna relación significativa entre temperatura, contenido de materia orgánica o la concentración de N-amoniacal (forma ionizada NH_4^+) y la emisión de amoníaco en la fosa de deyecciones. La evolución de las poblaciones a nivel cualitativo y cuantitativo para poder esclarecer algunos de los resultados obtenidos se desarrollará en próximos apartados.

Tabla 5.4.2.8. Emisión de NH₃ (mg/kgPV o g an/d) obtenidos a partir de la bibliografía considerando los siguientes factores: métodos analíticos, nivel de proteína, tipo de suelo y temperatura.

Referencia	Suelo [Emparrillado]	Procedimiento Analítico	kg PV	% PB	Temperatura °C	Emisión	
						mg/kg PV	g an/d
Amon <i>et al.</i> (2007)	Cama paja	Espectro- fotometría	47,0-105		23,5	110,4 s.e. 24,9	
			30,0-74,4		21,4	101,9 s.e. 13,4	
	Removiendo el estiércol		31,0-92,9		22,5	112,8 s.e. 29,4	
	diariamente de la paja.		31,8-104		20,5	89,8 s.e. 26,9	
			60,7-110		24,1	92,0 s.e. 42	
Blanes-Vidal <i>et al.</i> (2008)	Parcial	Fotoacústico	32,5-107		19,7	92,1 s.e. 17,7	
	Total		86-122,5			121,9 s.e. 28,8	
European Commission (2003)	Total		> 30				3,70 - 8,21
	Parcial						2,46 - 6,57
	Yacija						5,75 - 10,96
Fernández <i>et al.</i> (1999)			51,1-107	19,2-19,4	12,4 y 20,7		12,9 - 15,9
Hansen <i>et al.</i> (2014)	Total	Fotoacústico	55,5-102	13,6 y 15,9	21		6,0 y 7,8
Madrid <i>et al.</i> (2013)	Parcial	Infrarrojos	59,3-92,2	17,2-15,3	16,3-20,7	117,7	
	Parcial	Catalítico	60,6-94,7	15,5-15,1		94,2	
	Parcial		57,4-91,0	14,3-13,9		85,5	
Osada <i>et al.</i> (1998)	Parcia	Fotoacústico	31,9-87,1		16,4 y 16,6		3,0 y 3,23
Philippe <i>et al.</i> (2007a)	Total	Fotoacústico	23,4-110,2	18,1-15,6	20,5 s.e. 1,0		4,98 s.e. 0,85
van der Peet-Schwering <i>et al.</i> (1999)		Fotoacústico					7,4-8,9
Sun <i>et al.</i> (2010)	Parcial	Análisis de infrarrojos	20-120		18,2 s.e. 4	71-292†	
	Total				18,8 s.e. 3,7	95,6-304,4†	

†: Unidad de emisión en mg/kg PV^{0,75}

Tabla 5.4.2.9. Emisión de NH₃ (g/m²) de las deyecciones obtenidas a partir de la bibliografía considerando los siguientes factores: métodos analíticos, nivel de proteína, tipo de alojamiento y temperatura.

Referencia	Alojamiento	Procedimiento analítico	PV (kg)	% PB	Temperatura °C	Flujo m/s	Emisión (g/m ²)
Amon <i>et al.</i> (2004)	Tanque	Espectroscopia		19 a 18	0 a 12	0,05-0,51	0 a 2†
Amon <i>et al.</i> (2007)	Tanque	Espectroscopia			16,4 y 17,9		1,32 y 2,36
Espagnol <i>et al.</i> (2008)	Tanque				19,3	0,01-0,1	0,21 a 0,31
Le <i>et al.</i> (2008a)	Fosa	Trampas ácidas	56-117	12	19 s.e. 0,6 ME	504 L/m ² /h	1,12
	Fosa			12			0,69
	Fosa			12			0,95
	Fosa			18			3,11
	Fosa			18			2,68
	Fosa			18			2,07
Le <i>et al.</i> (2008b)	Fosa	Trampas ácidas	41	14,8	21 s.e. 0,8 ME	504 L/m ² /h	1,21 s.e. 0,26
	Fosa			15,4			0,95 s.e. 0,26
	Fosa			16,1			1,12 s.e. 0,6
Le <i>et al.</i> (2009)	Fosa	Trampas ácidas	58	12	19 s.e. 0,6 ME	504 L/m ² /h	1,30 s.e. 0,26
	Fosa			15			1,81 s.e. 0,34
Welford <i>et al.</i> (2003)	Cámaras		58-94	18 y 15	20	0,23 m ³ /h	0,20 a 0,41

†: Unidad de emisión en g/m³

ME: Módulo estanco

5.4.2.3. Emisión de óxido nitroso: efecto del nivel de fibra y proteína de la ración.

Siguiendo un esquema similar al seguido en los apartados anteriores, se analizará - de forma previa a la emisión - la concentración (mg/m^3) media detectada en el aire evacuado en los ME y en el vaciado de la CFC. En la Figura 5.4.2.6 se presenta la evolución circadiana de la concentración de N_2O . Los niveles de emisión incrementaron con la fase de cebo (0,10 s.e. 0,044; 0,26 s.e. 0,044 y 0,48 s.e. 0,046 mg/m^3 , para las Fases I, II y III, respectivamente) y aunque las diferencias entre las Fases I y II no alcanzaron significación estadística, si se diferenciaron estadísticamente de la FIII. Si bien el nivel de proteína de la ración no alteró la concentración ambiental de N_2O , el nivel de fibra si tuvo un efecto significativo y desigual, así en las dos primeras fases los módulos con los animales que ingirieron raciones con las mayores proporciones de fibra mostraron las menores concentraciones del gas, aparentemente, en la Fase III dicha tendencia se invirtió [Interacción nivel de Fibra x Fase [(FI: 0,07 y 0,14 s.e. 0,06), (FII: 0,20 y 0,32 s.e. 0,06) y (FIII: 0,74 y 0,23 s.e. 0,06 mg/m^3) para AF y NF, respectivamente; $P < 0,01$].

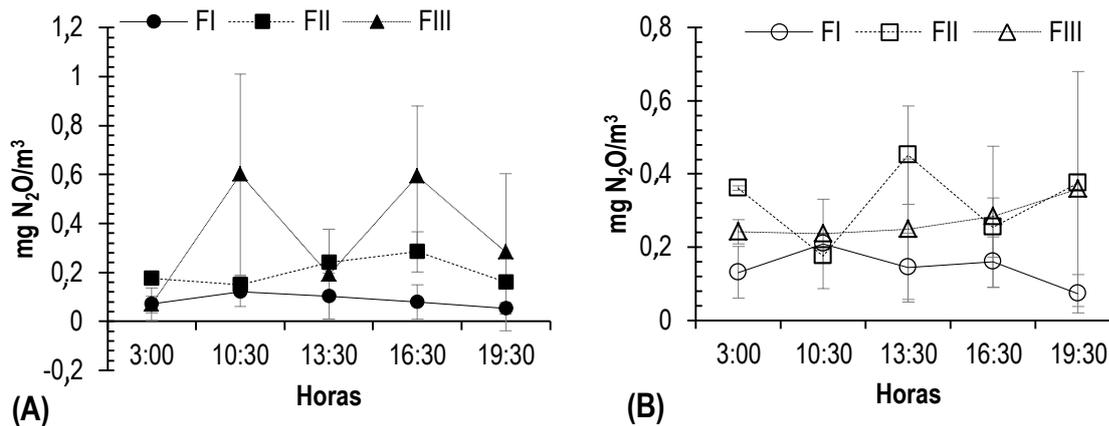


Figura 5.4.2.6. Evolución circadiana de la concentración diaria de N_2O en módulos estancos, siendo A, las concentraciones detectadas en los animales que recibieron los mayores niveles de fibra (AF) y B los menores (NF), las concentraciones corresponden a los diferentes tiempos de muestreo en las tres fases del engorde analizadas.

En el aire evacuado del espacio de cabeza de las CFC se apreciaron las variaciones circadianas que se presentan por fases en la Figura 5.4.2.7, las concentraciones medias en cada fase fueron de 0,60, 1,45 y 0,89 s.e. 0,16 mg/m^3 , para las fases de crecimiento I, II y III, respectivamente, no se observó una evolución regular dado que las mayores concentraciones se mostraron en la Fase II

($P < 0,05$), ni un efecto directo sobre la concentración derivado de la cantidad y tipo de fibra o proteína que recibían los animales.

La concentración media de N_2O en el espacio de cabeza de las CFC no fue modificada de forma relevante por el tiempo de muestreo (ver Figura 5.4.2.7). Remarcar el escaso valor de las concentraciones registradas dado su nivel de dependencia con el nivel de aireación, básicamente en el caso de los módulos estancos, pero también de las CFC. La emisión, considerando ambos parámetros: la concentración del gas y ritmos de renovación de aire se analizarán a continuación.

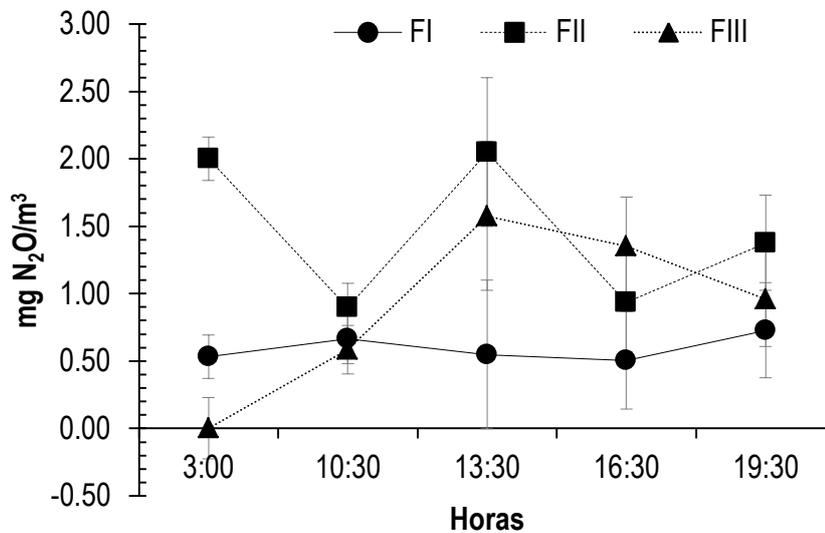


Figura 5.4.2.7. Evolución de la concentración diaria de N_2O en fosa de deyecciones registrada a diferentes tiempos de muestreo, correspondiente a tres fases de engorde de cerdos.

La emisión diaria de N_2O total en los ME (g an/d) fue muy variable, los niveles de emisión se situaron entre los 0,034 a 1,61 g an/d, dicha variabilidad se redujo consistentemente al expresar los valores por $kg PV^{0,75}$ (2,7 a 38 mg/kg $PV^{0,75}$), con lo cual se puso de manifiesto una relación positiva entre el desarrollo de los animales y los niveles de emisión. Incluso al corregir los niveles por el peso ($PV^{0,75}$) la emisión de N_2O siguió incrementando con el peso o desarrollo (4,35, 10,48 y 27,12 mg/kg $PV^{0,75}$ para las Fases I, II y III, respectivamente; $P < 0,05$). En la Tabla 5.4.2.10 se presentan de forma detalladas los niveles de emisión para cada uno de los efectos principales (fibra y proteína), así como su interacción con la fase de cebo. En ningún caso se apreciaron niveles significativos de emisión entre los niveles de proteína y fibra digestible (FND).

El valor medio de emisión de N₂O en cerdos en cebo fue \approx 0,46 g an/d, alcanzando un máximo a final del cebo (1,61 g an/d), lo que traducidos a equivalentes CO₂, a partir de la capacidad radiativa del N₂O (298 veces la del CO₂, para un horizonte de 100 años: Solomon *et al.*, 2007) la emisión media sería de 137,1 g CO₂ an/d, con un máximo de 480 g CO₂ an/d. Considerando además que la cabaña de cerdos de engorde en nuestro país es de 24.597.154 y 2.271.338 (26.868.492) millones de cabezas en cebo y reproductores, la emisión global de N₂O se situaría en torno a los 13.313,5 kg/d⁶ o 4.859,43 Tm/año. Dicha transformación a Eq-CO₂ nos permite comparar el impacto del N₂O con el impacto registrado en capítulos anteriores, con el CH₄, de esta forma el efecto invernadero del N₂O representaría el 10,87% más del impacto que representa el CH₄. No es posible comparar con el impacto de la emisión de NH₃ dado que la transformación de NH₃ a N₂O que se produce a partir de la radiación ultravioleta en la troposfera está escasamente documentada (Mosier *et al.*, 1998).

Al analizar los valores de emisión registrados y expresados por unidad de peso (kg PV^{0,75}) los niveles de emisión siguieron incrementando y lo hicieron de forma altamente significativa con la edad del animal, desafortunadamente los autores de la presente memoria no han podido contrastar los resultados obtenidos con otros autores que hayan descrito este efecto, pero sin duda ello debería estar relacionado con ambos, el desarrollo del tracto digestivo y del ecosistema ceco-colónico para propiciar la emisión de este gas tóxico. No obstante, en estudios de Osada *et al.* (1998) con independencia de remover o no el purín de la fosa cada semana, la emisión de N₂O fue constante entre los 32 y 65 kg PV (5 semanas de estudio: 3,9 a 4,7 mg/kg PV^{0,75}), registrando un incremento sustancial a los 72 kg PV (10,1 mg/kg PV^{0,75}) con posteriores reducciones a 79 y 86 kg PV (8,7 y 7,8 mg/kg PV^{0,75}), cambios que dicho autor atribuye a la lenta y variable adaptación de las especies microbianas involucradas en el proceso de Nitrificación y Desnitrificación.

No se apreció una relación positiva entre la composición de proteína de la ración y la emisión de N₂O, así aquellos animales que ingirieron las raciones con una menor proporción de proteína mostraron los mayores niveles de emisión (10,5 vs 17,5 s.e. 2,44 mg/kg PV^{0,75} para AP vs BP; $P < 0,05$). Un efecto contrario se observó en el caso de la fibra, los individuos que ingirieron una mayor cantidad de fibra y por tanto tuvieron una mayor disponibilidad de carbohidratos fermentables (MO) en el tracto ceco-colónico produjeron aparentemente más N₂O (15,3 vs 12,7 s.e. 2,44, para AF y NF, respectivamente; $P > 0,05$) y ello acaeció mayoritariamente en la tercera fase del cebo, coincidiendo con un mayor desarrollo de los compartimentos de fermentación. Ambas interacciones [FND x Fase y PB x Fase] tendieron a la significación ($P < 0,1$).

⁶ Estimado a partir del valor medio del estudio y emisiones reportadas por Medina *et al.* (2013).

Tabla 5.4.2.10. Emisión total de N₂O en sala (módulos estancos), en cerdos en cebo alimentados con raciones a dos concentraciones de proteína (PB: AP y BP) y dos de fibra (FND: AF y NF) en un sistema de alimentación en tres fases, a los 33, 66 y 102 kg PV (Fases I, II y III).

Ítems	Fase	Proteína (PB)		Fibra (FND)		s.e.	Nivel de significación				
		AP	BP	AF	NF		Fase	PB	FND	PB×Fase	FND×Fase
mg an/d	FI	70,6	33,7 ^y	33,2 ^y	71,2	303,1	*	ns	ns	ns	*
	FII	195	245,2 ^{xy}	182,8 ^y	248,5						
	FIII	794	1.419,7 ^x	1.612,0 ^{ax}	601,9 ^b						
mg/kg PV ^{0,75}	FI	5,9	2,8 ^y	2,7 ^y	5,9	4,22	***	*	ns	*	T
	FII	9,1	11,9 ^y	8,8 ^y	12,2						
	FIII	16,4 ^b	37,9 ^{ax}	34,5 ^x	19,8						
mg/g PBI	FI	0,25	0,13 ^y	0,13 ^y	0,25	0,36	**	**	ns	**	T
	FII	0,45	0,65 ^y	0,48 ^y	0,61						
	FIII	0,78 ^b	3,11 ^{ax}	2,48 ^x	1,42						
mg/g FNDI	FI	0,37 ^a	0,15 ^{ay}	0,15	0,37	0,26	***	*	ns	**	ns
	FII	0,51 ^a	0,71 ^{ay}	0,45	0,78						
	FIII	0,99 ^b	2,62 ^{ax}	2,15	1,45						

PB, proteína bruta (AP, alta proteína; BP, baja proteína); FND, fibra neutro detergente (AF, alta fibra; NF, normal fibra); FI-III, fase de crecimiento; s.e., error estándar de la media; mg an/d, mg animal y día; PV^{0,75}, peso metabólico; FNDI, fibra neutro detergente ingerida; PBI, proteína bruta ingerida.

^{ab} valores en la misma fila con superíndices distintos son diferentes ($P < 0,05$) en nivel de PB o nivel de FND; ^{xyz} en columna para la fase.

T: $P > 0,05$; ns, $P > 0,1$; *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

Cuando los niveles de emisión se corrigieron por la ingestión de PB (mg/gPBI) o FND (mg/g FNDI) se observó una evolución similar, los niveles de emisión incrementaron con la fase ($P < 0,01$), pero las diferencias sólo alcanzaron significación estadística en el caso de aquellos tratamientos que habían consumido los menores niveles de proteína ($P < 0,01$), siendo dicho efecto especialmente manifiesto en la última fase de cebo ($P < 0,01$).

En nuestras condiciones experimentales que pretenden simular los sistemas de explotación comercial, los niveles de emisión diaria de N₂O se situaron entorno a los 0,034 a 1,61 g an/d (0,02 a 0,89 L an/d)⁷ o corrigiendo por el peso de los animales entre los 2,7 a 38 mg/kg PV^{0,75}. Los niveles registrados se sitúan en el rango propuesto por la European Commission (2003) (Tabla 5.4.2.12), que propone tres niveles medios de emisión (g an/d) en función de la proporción de superficie emparrillada del corral: emparrillado total (0,05 a 0,41), parcial (1,61 a 9,42) y sin emparrillado y/o tipo yacija (0,14 a 0,67). Considerando que en nuestro caso los cubículos eran parcialmente emparrillados (52% aprox.) nuestros resultados estarían en el rango más bajo propuesto por dicha comisión. Confianza en nuestros resultados deriva del hecho que menores valores de emisión de N₂O expresados en mg/kg PV^{0,75} han sido descritos también en otros trabajos con el mismo tipo de emparrillado parcial (Blanes-Vidal *et al.*, 2008: 0,7 a 1; Dong *et al.*, 2007: 4,8; Osada *et al.*, 1998: 7,44 a 8,76), emparrillado total

⁷ Asumiendo 25°C y 1 atmósfera de presión.

(Costa y Guarino, 2009: 13 a 21; Philippe *et al.*, 2007a: 28) o suelos sólidos (Amon *et al.*, 2007: 1,43 a 9,12). En los trabajos citados previamente se han utilizado niveles dietéticos de proteína, fibra y condiciones experimentales (i.e. temperatura) equivalentes a las utilizadas en nuestro trabajo.

En nuestro trabajo el purín de la fosa era descargado o limpiado semanalmente, con este método se han descrito reducciones en la emisión de N_2O del 10%, en relación al procedimiento tradicional de fosas profundas (Osada *et al.*, 1998), aunque otros autores (Guarino *et al.*, 2003) pudieron confirmar dicha reducción en la emisión de CH_4 y NH_3 , no obstante en el caso del N_2O las emisiones se doblaron. Estas dos referencias constatan la variabilidad existente en este tipo de pruebas. En los trabajos citados, que figuran resumidos en la Tabla 5.4.2.12, los valores de emisión propuestos se han obtenido mediante metodologías de colección de deyecciones diversas, la utilización de fosas más profundas con vaciados más espaciados o sin vaciado, en algunos de ellos también se utilizaron fosas con pendiente (o en V) donde se pretende incrementar la separación heces/orina (fracción líquida y sólida de las excretas) y aumentar los niveles de anaerobiosis en la zona de colección. A pesar de las diferencias metodológicas descritas, nuestros resultados sugieren que no existe una relación clara y directa entre el tipo de fosa y su tiempo de vaciado con la emisión total de N_2O .

La formación de N_2O se produce por diferentes tipos de deficiencias durante el proceso de Nitrificación del NH_4 , impidiendo su transformación completa a N no contaminante (N_2). Dicha transformación va a suceder mediante un proceso continuo donde se encadenan dos procesos, Nitrificación y Desnitrificación. Durante el proceso de Nitrificación el N_2O es sintetizado cuando se dan algunos de los siguientes factores, la carencia de oxígeno o la acumulación de nitritos (Poth y Focht, 1985), sin embargo, durante el proceso de Desnitrificación el N_2O se sintetiza, por lo contrario, por la presencia de oxígeno y/o una baja disponibilidad de carbohidratos fermentables (Driemer y Van den Weghe, 1997; Poth y Focht, 1985).

Adicionalmente el N_2O puede formarse por actividad microbiana, esto es la oxidación (aeróbica o anaeróbica) del amonio (proceso que conocemos respectivamente como anamoxificación). La mayor parte de las especies que desarrollan estos procesos no son termófilas y las temperaturas elevadas (> 40 °C) las inhiben. Por último, se puede formar también N_2O por conversión abiótica del $NH_4^{(+)}$ bajo condiciones ácidas, lo que denominamos como quemodenitrificación (Oenema *et al.*, 2005; Petersen *et al.*, 2006). Se conoce la existencia de diversas rutas, pero se considera que el proceso de Nitrificación microbiana del NH_3 es la ruta mayoritaria para la formación de N_2O (Driemer y Van den Weghe, 1997) y que el último proceso de formación de N_2O - la quemodenitrificación - puede ser descartado dado que en ningún caso se apreciaron las condiciones de acidificación que requiere dicha ruta bioquímica

(Petersen *et al.*, 2006). De esta forma, la síntesis de N_2O responde a la combinación de situaciones de aerobiosis-anaerobiosis que no se cumpliría en el purín, exceptuando tras la formación de una capa superficial “crash” en la fosa o en el resto de superficies y que permita generar las situaciones de anaerobiosis necesarias para su síntesis. Dadas la diversidad de rutas bioquímicas, y por tanto de controles que interviene en la síntesis de N_2O su síntesis va a tener un componente estocástico muy importante y bajo esta perspectiva deben ser discutidos los resultados.

En nuestro caso, aquellos tratamientos en que los animales ingirieron las mayores cantidades de PB, excretaron mayores cantidades N y emitieron las mayores cantidades de NH_3 , dichos tratamientos mostraron los registros más bajos en la emisión de N_2O . Es decir, no existió una relación positiva entre la concentración y/o pérdidas de NH_3 en el purín y la emisión de N_2O , de forma que reduciendo la volatilización de NH_3 no necesariamente se reducirán la emisión del N_2O . Nuestros resultados confirman, en granja, los resultados previos descritos por otros autores durante la aplicación agronómica del purín porcino (Clemens *et al.*, 1997), y si bien es cierto que la síntesis de N_2O se incrementa al hacerlo la concentración de la molécula oxidada, los nitritos (Poth y Focht, 1985), la presencia en el medio del N reducido en forma de amonio podría no tener el mismo efecto y mejorar el proceso de Nitrificación y por tanto reduciendo las pérdidas de N_2O .

En relación al efecto de la ingestión de FND sobre la emisión de N_2O , existen muy pocos trabajos en los que se analice el efecto de este tipo de manipulaciones sobre su emisión (Cardenas *et al.*, 2007). En general, se acepta que una reducción en la concentración de materia orgánica (i.e. AGV) en las deyecciones puede reducir la emisión de N_2O . Sin embargo, esta relación positiva entre la presencia de C-soluble (AGV) en las deyecciones y el incrementó en la emisión de N_2O fue cuestionado por el grupo de Scholefield *et al.* (1997), quienes demostraron que la adición de C-soluble a las deyecciones redujo la tasa de emisión N_2O / N_2 dado que ello estimuló la transformación de N_2O como aceptor de electrones en las poblaciones desnitrificantes, produciendo N_2 (de Wever *et al.*, 2002). Nuestros resultados estarían en la línea de estos últimos autores dado que un incrementó en la ingestión/concentración de fibra de la ración y el consiguiente incremento de fibra fecal - como material potencialmente fermentable - en las heces redujeron de forma manifiesta la emisión de N_2O . Es posible que la forma de análisis del proceso de síntesis de N_2O deba ser realizado en su conjunto, dado que dicho proceso es posible que responda a la acción combinada de los diferentes factores y la relación que se establece entre los sustratos potencialmente fermentables en un proceso altamente estocástico.

En la Tabla 5.4.2.11 se presentan los niveles de emisión de N₂O registrado en las CFC, el bajo nivel de emisión de N₂O en fosa (0,05-0,92% medio de la emisión total) indica que la síntesis se produjo de forma previa a su llegada a fosa. El patrón de emisiones registradas confirman las hipótesis de Cabaraux *et al.* (2009) y Philippe *et al.* (2007a), por las cuales el N₂O se originaría mayoritariamente en el suelo de los cubículos, estén o no emparrillados. Los datos disponibles en la literatura se caracterizan por una elevada variabilidad y se situarían entre 6 y 410 mg an/d (Cabaraux *et al.*, 2009; European Commission, 2003; Osada *et al.*, 1998). Nuestros resultados se situarían en este entorno, aunque cabe señalar que la mayor parte de citas relativas a la producción de N₂O en el purín se refieren a resultados obtenidos en fermentadores “*in vitro*” en los cuales se ha regulado el nivel de aireación, temperatura y anaerobiosis. En tales circunstancias los niveles de emisión son siempre más elevados (Tabla 5.4.2.11), aunque deben de ser expresados por metro cúbico (m³) dada la imposibilidad, como es nuestro caso, de expresarlo por tasas de producción referidas al animal.

En el purín, no pudimos detectar ningún efecto de los tratamientos analizados sobre la emisión de N₂O. No obstante, si mostraron un efecto significativo cuando los resultados se expresaron por unidad de MS. Sorprendentemente se observó una respuesta diametralmente opuesta a la observada en la emisión total. La emisión de N₂O expresada en mg/100 gMS de purín disminuyó con el desarrollo de los animales y el de su sistema digestivo (0,17, 0,14 y 0,05 para las Fases I, II y III, respectivamente) y con los niveles de fibra (0,09 y 0,14 para los animales que recibieron las raciones con AF y NF, respectivamente) e incremento con el nivel de PB (0,14 vs 0,10 para AP y BP, respectivamente), siendo estas diferencias más pronunciadas entre las Fases II y III (Interacciones nivel de FND o PB x Fase; ambas $P < 0,05$). Cuando los valores de emisión se expresaron por unidad de N total en purín la evolución fue muy similar. Desafortunadamente no hemos podido contrastar nuestros resultados con referencias de otros autores que se planteasen estudios similares.

Tabla 5.4.2.11. Emisión de N₂O en fosa de cerdos en crecimiento, determinado la emisión gaseosa en 3 fases (PV= 33, 66 y 102 kg).

Ítems	Fase	Proteína (PB)		Fibra (FND)		s.e.	Nivel de significación				
		AP	BP	AF	NF		Fase	PB	FND	PB*Fase	FND*Fase
mg an/d	FI	0,66	0,30	0,28	0,68	0,17	ns	ns	ns	ns	ns
	FII	0,59	0,82	0,56	0,85						
	FIII	0,85	0,27	0,51	0,62						
mg/m ³ purín	FI	9,32	5,35	6,60	8,07	2,11	ns	ns	ns	ns	ns
	FII	6,53	7,67	6,52	7,68						
	FIII	6,21	4,80	7,41	3,61						
mg/100g MS en purín	FI	0,23 ^{ax}	0,10 ^b	0,10 ^b	0,23 ^{ax}	0,03	**	ns	*	*	*
	FII	0,13 ^{axy}	0,15 ^a	0,12 ^a	0,16 ^{ax}						
	FIII	0,05 ^{ay}	0,05 ^a	0,07 ^a	0,03 ^{ay}						
mg/g N total purín [†]	FI	0,29 ^{ax}	0,12 ^b	0,12 ^b	0,29 ^{ax}	0,038	*	ns	*	*	*
	FII	0,19 ^{axy}	0,18 ^a	0,14	0,23 ^x						
	FIII	0,07 ^{ay}	0,09 ^a	0,11	0,05 ^y						

PB, proteína bruta (AP, alta proteína; BP, baja proteína); FND, fibra neutro detergente (AF, alta fibra; NF, normal fibra); FI-III, fase de crecimiento; s.e., error estándar de la media; mg an/d, mg animal y día; PV^{0,75}, peso metabólico.

^{ab} valores en la misma fila con superíndices distintos son diferentes ($P < 0,05$) en nivel de PB o nivel de FND; ^{xy} en columna para la fase.

ns, $P > 0,05$; *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$

†, Valores x10²

Los trabajos de Le *et al.* (2008ab) y Zhang *et al.* (2007) muestran valores registrados en fosa, captando la emisión de gas en un sistema superficial, muy similar al utilizado en la presente memoria, en este caso no se describieron las emisiones de N₂O por no ser detectables (Zhang *et al.*, 2007). Posiblemente el mayor nivel de aireación evitó toda posibilidad de detección. En este mismo sentido podemos señalar que los datos de Clark *et al.* (2005) aunque fueron determinados en un fermentador artificial, las emisiones de gas se determinaron mediante cámaras de superficie, en este caso tampoco se pudieron detectar niveles significativos de N₂O emitido. Por ello podríamos señalar que los bajos niveles registrados en nuestra memoria estarían avalados por la dificultad de determinar este gas en la fosa cuando los purines son sometidos a mayores niveles de aireación y confirmarían nuestro procedimiento experimental, que permitió detectar con suficiente precisión la producción de N₂O en las condiciones experimentales que reflejan aquellas en las que normalmente el purín es almacenado en las condiciones comerciales de explotación.

Tabla 5.4.2.12. Emisión de N₂O (mg/kgPV^{0,75} o g an/d), obtenidos a partir de la bibliografía considerando los siguientes factores: métodos analíticos, tipo de suelo y temperatura.

Referencia	Tipo de piso [Emparrillado]	Procedimiento Analítico	PV kg	Temperatura °C	Emisión	
					mg/kg PV ^{0,75}	g an/d
Amon <i>et al.</i> (2007)	Cama paja	Espectro-fotometría	47,0-105	23,5	9,12 (3,1 s.e. 1,3†)	
			30,0-74,4	21,4	2,57 (0,96 s.e. 0,54†)	
	Removiendo el estiércol diariamente de la paja		31,0-92,9	22,5	7,22 (2,58 s.e. 1,9†)	
			31,8-104	20,5	1,43 (0,50 s.e. 0,22†)	
			60,7-110	24,1	4,01 (1,32 s.e. 0,4†)	
			32,5-107	19,7	1,59 (0,55 s.e. 0,17†)	
Blanes-Vidal <i>et al.</i> (2008)	Parcial	Fotoacústico	86-122,5		0,7 (0,22 s.e. 0,04†)	
Costa y Guarino (2009)	Total	Fotoacústico	(70 kg)	18,7 (15-21)	13 (4,8†)	
	Total		(70 kg)	27 (25,9-27,7)	21 (7,38†)	
Dong <i>et al.</i> (2007)&	Parcial	Cromatografía	42-90	-9 a 32	4,8 (1,72 s.e. 1,5†)	
European Commission (2003)	Total				0,05 - 0,41	
	Parcial				1,61 - 9,42	
	Yacija				0,14 - 6,7	
Osada <i>et al.</i> (1998)	Parcial	Fotoacústico	31,9-87,1	16,4 y 16,6	7,44-8,76	
Philippe <i>et al.</i> (2007a)‡	Total	Fotoacústico	23,4-110,2	20,5 s.e. 1,0	(28) 0,67 s.e. 0,52	

(†) Unidad de emisión en mg/kg PV;

& removiendo el estiércol 2 veces por día.

‡, nivel de PB entre 18,1 a 15,6%

5.4.3. Condiciones de fermentación y evolución de las poblaciones microbianas en el intestino grueso a lo largo del tracto ceco-colónico y en el purín: Efecto del nivel de fibra y proteína de la ración.

5.4.3.1. Condiciones de fermentación en el intestino grueso.

En este apartado se presentaran y analizarán los valores medios de pH, concentración de N amoniacal (N-NH₃), ácidos grasos volátiles (AGV) y sus proporciones molares (de AGV) registradas al inicio y final del intestino grueso (IG) de cerdos alimentados con raciones convencionales suplementadas con diferentes niveles de PB y FND a final del cebo (21 semanas). Los componentes dietéticos que escapan de la digestión enzimática alcanzan los tramos posteriores del tracto digestivo donde son susceptibles de ser fermentados por las poblaciones microbianas simbióticas que cohabitan dichos compartimentos, en qué medida puedan ser fermentados dependerá del tipo de fibra, estructura y solubilidad, grado de lignificación, tamaño de partícula y tiempo de retención de la digesta en el intestino grueso (Cao *et al.*, 2013). De la presencia de nitrógeno, azufre y otros minerales, esenciales, dependerá el crecimiento de dichas poblaciones microbianas y su actividad sobre quilo (Varel *et al.*, 1997). Los productos generados durante el proceso de la fermentación (lactato y succinato) van a ser metabolizados a AGV de cadena corta (acético, propiónico, butírico), urea, ciertos gases (H₂, CO₂ y CH₄) y calor (Jørgensen *et al.*, 2011), finalmente la mayor parte de los AGV generados son absorbidos a través de la pared ceco-colónica y van a contribuir de forma significativa al metabolismo energético del animal (7,1 al 30% de las necesidades de mantenimiento del cerdo, Anguita *et al.*, 2006; Bergman, 1990; Varel y Yen, 1997) y los gases excretados vía respiratoria y flatulencias (Jørgensen *et al.*, 2011).

El impacto de diferentes proporciones de fibra y proteína sobre los parámetros digestivos (pH, NH₃ y AGV) y sus interacciones se muestran en Tabla 5.4.3.1. Los valores medios de pH incrementaron a lo largo del intestino grueso (IG: 6,0 y 6,3 s.e. 0,06 para ciego vs colon, respectivamente; $P < 0,01$) y dicha evolución no fue alterada por el nivel de PB ingerida ($P > 0,05$), aunque sí lo fue por el nivel de FND (Interacción FND x IG: $P < 0,01$), se apreció un incremento significativo en el pH de los animales que habían consumido una mayor cantidad/proporción de FND (pH: 6,5 vs 6,1 s.e. 0,08 para AF vs NF, respectivamente; $P < 0,05$). Tanto el ligero incremento en el pH de la digesta en su tránsito por el tracto ceco-colónico (Urriola y Stein, 2010), como el efecto registrado en relación a la PB y FND han sido descritos previamente en bibliografía (Lynch *et al.*, 2007a, 2008).

En relación a la concentración de N-NH₃, esta incrementó a medida la digesta recorrió por el IG ($P < 0,05$) (69,7 vs 156,3 s.e. 8,38 mg/L en ciego vs colon, respectivamente), aunque dicha evolución no fue homogénea y el incremento en la concentración de N-NH₃ fue mayor en aquellos animales que habían recibido las raciones con una menor proporción de proteína y fibra (Interacciones PB y FND x IG; $P < 0,05$). La concentración de N-NH₃ en los compartimentos de fermentación (i.e. colon) responde a un doble equilibrio entre la degradación-biosíntesis microbiana y los procesos de intercambio (absorción-reciclaje) a través de la pared del IG. En los fermentadores post-gástricos recibiendo, como es nuestro caso, proteínas de elevada digestibilidad la mayor parte del N-NH₃ presente en el compartimento y el N bacteriano se han originado a partir del reciclaje de N endógeno a través de la pared ceco-colónica (Abecia *et al.*, 2008), cuyo alcance viene delimitado por el gradiente de concentraciones y la permeabilidad, limitada de la pared (Van Soest, 1994). El hecho que el N-NH₃ incrementase a lo largo del tracto ceco-colónico puede ser un indicador de la degradación microbiana de los residuos de N indigestible, pero básicamente el reciclaje de N prevalece sobre los procesos de absorción y biosíntesis. El hecho que los animales que ingirieron una mayor cantidad de fibra (AF vs NF) tuvieran una mayor disponibilidad de energía fermentable (FND) y crecimiento microbiano podrían explicar una mayor utilización del N-NH₃ disponible, con una reducción en la concentración de N-NH₃ colónico, siempre que exista una limitación en el reciclaje endógeno de N. Este hecho coincide con los resultados de aquellos autores que tras administrar almidón en los compartimentos de fermentación post-gástricos tuvieron un incremento neto en la producción microbiana con un descenso marcado en la concentración colónica de NH₃ (Surra *et al.*, 1997), una mayor utilización microbiana podría ser la responsable de menores concentraciones de N amoniacal en dicho compartimento. Es más difícil, no obstante, explicar la diferencia registrada en los incrementos de las concentraciones colónicas de N-NH₃, que fueron inferiores en los cerdos que ingirieron las mayores cantidades de proteína, siempre que la proteína excedentaria o su interacción con la presencia de fibra pudiesen resultar en un incremento de la energía fermentable disponible y actuaran mecanismos similares a los descritos con la fibra.

Durante el tránsito de la digesta por el tracto ceco-colónico la concentración de AGV se redujo (efecto IG: $P < 0,05$), reflejando la desaparición del sustrato y por tanto los procesos de fermentación y generación de AGV. Dicha evolución fue independiente de los niveles de ingestión de PB (154,1 y 162,2 s.e. 9,84 mM para AP y BP, respectivamente; $P > 0,05$), pero no de la ingestión de fibra y el descenso fue más pronunciado en los animales que ingirieron las mayores concentraciones de fibra (de 175,6 a 110,7 y de 174 a 171 s.e. 13,8 mM para AF y NF, Interacción FND x IG; $P < 0,05$). Esta

correlación negativa entre los niveles de fibra y la concentración de AGV en el tracto ceco-colónico coincide con los resultados previos propuestos por Cao *et al.* (2013).

Las diferencias registradas deben ser analizadas con una doble perspectiva, la primera es que la concentración de AGV depende de dos factores, producción y absorción. En relación al segundo proceso, la absorción depende del pH, concretamente en la evolución del pH a lo largo del tracto analizado y el punto isoeléctrico (pK) de la mezcla de AGV (a > pH, hay más disociación y absorción más lenta). La tendencia a una mayor acidez en los tramos anteriores y la relación de concentraciones podría explicar parcialmente las diferencias registradas.

En relación al segundo factor, la producción de AGV, esta depende de la composición del material indigestible que alcanza el tracto ceco-colónico y del ecosistema del compartimento (Morales *et al.*, 2002). La FND de la pulpa es altamente fermentable y ello implica, en función de su proporción en la ración, de una rápida fermentación y adaptación de las poblaciones microbianas en el intestino grueso pero también en intestino delgado, de esta forma una fracción considerable (≈ 50 ; Gidenne y Jehl, 1996) de la FND digerida lo es en el intestino delgado. Por ello podemos hipotetizar que una mayor disponibilidad microbiana y de FND podía desplazar los procesos de fermentación a tramos anteriores del intestino (ID,) con lo cual una menor proporción de sustrato alcanzaría el colon terminal y explicaría el descenso en la concentración molar registrada. Señalar que otros autores han descrito con otro tipo de raciones una relación positiva entre fibra y concentración de AGV en las heces (Canh *et al.*, 1998a-d; Hansen *et al.*, 2007).

Las proporciones molares de los AGV mayoritarios (acético, propiónico y butírico) se situarían en los rangos propuestos previamente por otros (Christensen *et al.*, 1999; Morales *et al.*, 2002; Urriola *et al.*, 2013) y en su tránsito a través del tracto ceco-colónico, junto al descenso en la concentración de AGV se observó una reducción significativa en la proporción de acético, un incremento en la de butírico (IG: $P < 0,05$), sin que se apreciaran modificaciones en las proporciones de propiónico (IG: $P > 0,05$).

En relación al tratamiento experimental, las proporciones molares no fueron modificadas por la proporción de PB en la ración ($P > 0,05$; Tabla 5.4.3.1), no obstante, si lo fueron por nivel de FND ($P < 0,05$), así los animales que ingirieron la raciones con una mayor proporción de fibra mostraron mayores concentraciones acético y menores de butírico (Tabla 5.4.3.1). Es sabido que niveles altos en fibra inducen una fermentación más acética (Hansen *et al.*, 2007) y esta evolución coincide con resultados descritos por Morales *et al.* (2002). La proporción de butírico incrementó de forma significativa, ello puede ser debido a un efecto artefactual por una reducción en la proporción de

acético o debido a la variación en los componentes de la digesta. La fermentación paulatina de la fibra podría dar lugar a un incrementó proporcional en la fermentación de detritus no digeridos, entre ellos fracciones de N no digestible lo que podría dar lugar a un incrementó en la presencia de butírico y los ácidos AGV ramificados (isobutírico y isovalérico) (Lynch *et al.*, 2007b).

Tabla 5.4.3.1. Condiciones de fermentación a nivel digestivo: efecto del nivel de proteína (PB) y fibra neutro detergente en la dieta (FND).

Ítems	Tramo (IG)	PB		FND		s.e.	Nivel de significación				
		AP	BP	AF	NF		IG	PB	FND	IG×PB	IG×FND
pH	Ciego	5,9	6,1	5,7 ^y	6,1	0,08	**	ns	ns	ns	**
	Colon	6,3	6,2	6,5 ^{ax}	6,1 ^b						
N-NH ₃ , mg/L	Ciego	75,3 ^y	64,1 ^y	55,5 ^y	84,0 ^y	11,85	***	ns	ns	*	*
	Colon	130,5 ^{bx}	182,1 ^{ax}	106,7 ^x	145,9 ^x						
AGV, mM	Ciego	169,6	180,8	175,6 ^x	174,8	13,92	*	ns	*	ns	*
	Colon	138,8	143,5	110,7 ^{by}	171,5 ^a						
Acético, %	Ciego	60,9	64,2 ^x	64,1 ^x	61,0 ^x	1,33	**	ns	*	ns	ns
	Colon	57,2	57,2 ^y	59,0 ^y	55,5 ^y						
Propiónico, %	Ciego	24,3	23,8	24,5	23,5	0,87	ns	ns	ns	ns	ns
	Colon	23,4	22,4	22,0	23,8						
Butírico, %	Ciego	10,9	8,9 ^y	7,8 ^{by}	11,9 ^a	0,74	**	ns	**	**	ns
	Colon	11,5	14,0 ^x	11,8 ^x	13,7						
Iso-Butírico, %	Ciego	1,1 ^y	1,3	1,2	1,2	0,27	**	ns	ns	ns	ns
	Colon	2,3 ^x	1,9	2,2	2,1						
Iso-Valérico, %	Ciego	1,1 ^y	0,6 ^y	1,1 ^y	0,7 ^y	0,43	***	ns	ns	ns	ns
	Colon	3,3 ^x	2,8 ^x	3,1 ^x	3,0 ^x						
Valérico, %	Ciego	1,7	1,1	1,2	1,6	0,30	ns	ns	ns	ns	ns
	Colon	2,2	1,7	2,0	2,0						

Superíndice distintos en fila (^{a, b}) indican diferencia significativas en nivel de PB o FND, y en columna (^{y, x}) para tramos ($P < 0,05$). ns, $P > 0,05$; *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$

5.4.3.2. Condiciones de fermentación: purín.

En Tabla 5.4.3.2 se presentan los valores de pH, las concentraciones de N amoniacal (N-NH₃) y ácidos grasos volátiles (AGV), así como sus proporciones molares registradas en las fosas de deyecciones, generadas por cerdos alimentados con distintos niveles de PB y FND en fase final de cebo. Los valores medios de pH oscilan entre los valores descritos previamente por otros autores (Conn *et al.*, 2007; Le *et al.*, 2008a) en purines frescos almacenados en fosa [pH: 5,7 - 8,1], el nivel de acidez fue modificado por el nivel de PB de la ración (7,5 vs 7,0 s.e. 0,12 para las deyecciones de los animales que ingirieron AP o BP, respectivamente; $P < 0,05$). La concentración media de N-NH₃ en el purín fue elevada (4,55 g/L o 267,2 mM), aunque dentro del rango descrito por otros autores (96 - 500 mM: Conn *et al.*, 2007; Le *et al.*, 2008a; Snell-Castro *et al.*, 2005), incrementó de forma significativa en purines de los animales que ingirieron los niveles más altos de proteína (6,2 vs 2,9 g/L en fosas de cerdos alimentados con AP y BP, respectivamente; $P < 0,001$). Las elevadas concentraciones de N-NH₃

en el purín y su respuesta positiva a los niveles de proteína de la ración coinciden, en general, con la bibliografía existente (Canh *et al.*, 1998a; Portejoie *et al.*, 2004; Sutton *et al.*, 1999). Aunque en ningún caso los niveles dietéticos de fibra alteraron la concentración de N amoniacal.

La acumulación de AGV en las deyecciones fue importante (199,3 mM/L), aunque se detectó una variación residual importante entre muestras (s.e. = 33,70; CV \approx 20%), por ello aunque las diferencias aparentes entre los tratamientos fueron relevantes tanto en los que se refiere a PB (219,3 vs 162,7; para AP y BP, respectivamente) como a FND (176,7 vs 205,3 para NF y AF, respectivamente) las diferencias en ningún caso alcanzaron significación estadística.

El pH en los diferentes compartimentos de fermentación, entre otros, está regulado por la concentración/acumulación de los AGV y amonio en el medio, en el primer caso la acumulación de AGV acidificará, y la del segundo compuesto, el NH₃, lo alcalinizará. En este caso, la elevada concentración de amonio en el purín fue el factor que determinó los niveles de pH, así los animales que ingirieron la ración con un mayor porcentaje de proteína mostraron las mayores acumulaciones de NH₃ y dichas acumulaciones se reflejaron en un pH más alcalino. No obstante, ni la acumulación de amoníaco, ni los pH registrados dieron lugar a una mayor emisión de amoníaco (NH₃) en los correspondientes purines (Apartado 5.4.2.2, Tabla 5.4.2.7). En este sentido se ha descrito la estrecha relación entre el equilibrio NH₃/NH₄⁺ y los niveles de pH, con una predominancia de NH₃ (emisión de gas) gas en los pH alcalinos. Es difícil explicar, dada la acumulación de NH₄⁺ en el medio y los niveles de pH, los escasos niveles de emisión de NH₃ y que las diferencias en los niveles de pH no se reflejasen en diferencias en los niveles de emisión. Probablemente los niveles de aireación del purín que se limitaron para facilitar la detección de otros gases tóxicos (i.e. N₂O) sea la causa más probable que pueda explicar los resultados obtenidos.

Tabla 5.4.3.2. Condiciones de fermentación en el purín.

Ítem	PB		FND		s.e.	Significación	
	AP	BP	AF	NF		PB	FND
pH	7,5 ^a	7,0 ^b	7,2	7,2	0,12	*	ns
N-NH ₃ , g/L	6,2 ^a	2,9 ^b	5,1	4,1	0,39	***	ns
AGV T, mM	219,3	162,7	176,7	205,3	33,70	ns	ns
VFA, mol /100 mol							
Acético	66,7	64,4	65,8	65,4	1,02	ns	ns
Propiónico	14,2	17,8	14,9	17,1	0,26	T	T
Butírico	11,6	10,3	11,4	10,5	2,56	ns	ns
Iso-Butírico	2,8	2,7	3,0	2,5	0,60	ns	ns
Iso-Valérico	3,3	3,0	3,3	3,0	0,50	ns	ns
Valérico	1,4	1,7	1,6	1,5	0,18	ns	ns

Superíndices distintos en fila (^a, ^b) indican diferencias significativas en nivel de PB ($P < 0,05$). T, $P > 0,01$; ns, $P > 0,05$; *, $P < 0,05$; ***, $P < 0,001$.

El nivel de FND no indujo variaciones significativas a nivel del pH ni en el N-NH₃, en este sentido señalar que al incrementar los niveles de fibra en la ración, lo hace el sustrato potencialmente utilizable por los microorganismos del intestino, incrementando la producción de AGV y reduciendo las concentraciones del N que es utilizado para la síntesis microbiana (Zervas y Zijlstra, 2002), este proceso intestinal debería reflejarse también en las heces con una reducción significativa del pH en el purín (Canh *et al.*, 1998a; Dourmad y Jondreville, 2007). Posiblemente, si existió este proceso, estuvo enmascarado por la elevada concentración y alcalinidad del amoníaco presente en el medio.

Las proporciones medias de acético, propiónico y butírico en purín (65,5, 15,7 y 11,0, respectivamente) reflejaron las registradas en colon para el butírico (57,2, 22,9 y 12,7), y en general los valores registrados coinciden con los valores previos publicados (Cerisuelo *et al.*, 2012; Conn *et al.*, 2005; Le *et al.*, 2008; Snell-Castro *et al.*, 2005), en general el tratamiento experimental tuvo un escaso efecto sobre las condiciones de fermentación, sólo se apreció un ligero aumento en la proporción de propiónico, que tendió a la significación en las deyecciones correspondientes a los animales que habían ingerido las raciones con una mayor proporción de PB o FND ($P < 0,06$ y $P < 0,10$).

5.4.3.3. Concentración de bacterias totales y arqueas metanogénicas en intestino grueso.

En la Tabla 5.4.3.3 se presentan las concentraciones medias de bacterias totales y arqueas determinadas al inicio [ciego] y al final del compartimento de fermentación, el colon medio. Expresadas en valores absolutos [nº Copias / g MF] o en el caso de las arqueas, también en su valor relativo [% del tipo específico de arqueas en relación al total de arqueas], se presenta también el análisis de varianza de los factores principales objeto del presente estudio, tramo [ciego vs colon medio], proteína [alta vs baja proporción de proteína en la ración], fibra [alto vs normal nivel de fibra digestible en la ración] y sus interacciones. En muchos casos los factores principales interaccionaron entre sí y por tanto en la tabla se presentan los valores medios obtenidos para cada ración experimental. Se presentan también los valores del cuadrado medio estimado para cada uno de los factores principales analizados. La distribución bacteriana y de arqueas en los diferentes tramos del intestino grueso tiene su continuación en el apartado siguiente (5.4.3.4), donde se presentan y analizan, con una estructura similar la distribución de las mismas poblaciones en las deyecciones o purín. Dada las diferencias en la distribución estadística de ambos parámetros los resultados se han presentado en capítulos independientes, aunque una parte importante de la discusión pueda ser conjunta.

La concentración de bacterias totales (BT) incrementó a lo largo del IG, los valores medios determinados en el ciego (8,85) fueron inferiores a los registrados en el colon medio (23,98 s.e. 0,574)

y dicho incremento fue en general independiente del tratamiento experimental, aunque se observó que en aquellos animales que recibieron la ración con la proporción de fibra más bajo (NF), al incrementar el nivel de proteína las concentraciones de bacterias totales incrementaron, mientras que en aquellos que recibieron el nivel alto de fibra (AF) se observó el efecto contrario, los títulos disminuyeron (Interacción PB x FND; $P < 0,04$).

Nuestros resultados coinciden con trabajos previos, los que han demostrado un incremento de la concentración (Butine y Leedle, 1989; Jensen y Jørgensen, 1994) y diversidad microbiana (Roca, 2008; Roca *et al.*, 2014) en el tránsito de la digesta a lo largo del compartimento de fermentación. No obstante, no pudimos constatar la relación positiva entre los niveles de fibra fermentable y los títulos de BT, como se ha descrito en otros trabajos en los que se refiere a la concentración de bacterias celulolíticas y hemicelulolíticas [i.e. *F. succinogenes (intestinalis)*, *R. albus*, *R. flavefaciens*, *Butyrivibrio* spp., *Bacteroides* spp., Varel *et al.* (1984, 1997)] o Lácticas y Bifidobacterias (Gibson y Wang, 1994; Lynch *et al.*, 2007a).

La concentración absoluta de arqueas metanogénicas hidrogenotróficas (AMH_{Ab}) incrementó también con la evolución del quilo a través del tracto ceco-colónico y los valores medios registrados en colon medio (13,07) fueron superiores a los registrados en el ciego (3,38, s.e. 0,30; $P < 0,05$). En este caso se apreció un efecto significativo de la ración sobre los títulos AMH_{Ab} registrados, así los títulos registrados en animales que ingirieron la ración con un mayor contenido en proteína y bajo en fibra (APNF) fueron superiores al resto de los grupos, incluyendo aquellos cerdos que habían recibido el mismo nivel proteína pero con un nivel de fibra alto (T=0,08) (8,13, 7,90 y 7,25 s.e. 0,427 para APAF, BPAF y BPNF; $P < 0,05$), así la proteína y fibra como efectos principales, interaccionaron (Interacción PB x FND; $P < 0,02$), tampoco pudimos detectar dicho efecto al inicio del compartimento (muestras Cg), con lo cual la interacción PB x IG también alcanzó significación estadística ($P < 0,05$).

El incremento en los títulos de arqueas, en general y AMH_{Ab} en particular puede ser explicado atendiendo a dos factores, el primero, porque mejoran las condiciones de fermentación propias de las arqueas (pH, anaerobiosis, presión osmótica, etc.), la segunda debería ser la competencia por el sustrato, efectivamente la degradación de los diferentes sustratos que alcanzan el compartimento de fermentación es un proceso complejo donde actuarán sincrónicamente distintas poblaciones en las cuales las arqueas acetoclásticas o hidrogenotróficas ocupan las últimas posiciones. A lo largo del colon este proceso de fermentación progresará y con ello deberán hacerlo aquellas especies que actúan en los últimos estadios de las cadenas tróficas de degradación. Podemos encontrar referencias bibliográficas de las concentraciones registradas de AMH_{Ab} (Luo *et al.*, 2012; Su *et al.*, 2014) y la

evolución creciente de dichos títulos a través del colon (Butine y Leedle, 1989), es cierto que en otros casos, dicha evolución no se ha descrito aunque se detectó a lo largo del colon un incremento en la biodiversidad y actividad de dichas poblaciones (Cao *et al.*, 2012).

La mayor producción de metano se realiza en los compartimentos de fermentación pre-gástricos (i.e. rumen; Monteny *et al.*, 2001) y es por ello que en dicho compartimento la cinética de producción de CH₄ y su relación con las especies implicadas están más estudiados. La fermentación ruminal de raciones fibrosas, va a dar lugar a un incremento en la concentración (\approx producción) de acético, disponibilidad de H⁺ (Morgavi *et al.*, 2010), promoción de bacterias hidrogenotróficas y finalmente la producción de CH₄. No obstante, la relación entre la concentración de AMH y producción de metano no está clara (Yáñez-Ruiz *et al.*, 2008) y se ha demostrado que el número de copias de metanógenas no se relaciona con la producción de metano (Zhou *et al.*, 2011), la distribución de especies, niveles de biodiversidad y la promoción de ciertas especies metanogénicas van a ser los factores de los cuales va a depender fundamentalmente la producción cuantitativa de CH₄ (Zhou *et al.*, 2010, 2011). Nuestros resultados podrían señalar en este sentido que los niveles dietéticos de fibra que dieron lugar a una mayor producción efectiva de metano (Tabla 5.4.2.2; apartado 5.4.2.1) no se correspondieron con aquellos niveles en los que se detectaron las concentraciones más elevadas de AMH, que sólo mejoraron en aquellos animales sujetos a niveles dietéticos de fibra bajos y niveles proteicos altos (APNF). En cerdas lactantes Cao *et al.* (2013) no encontraron diferencias en la cantidad de bacterias celulolíticas, pero sí una disminución significativa en la biodiversidad y población metanogénica en intestino grueso al incrementar los niveles de fibra.

Tampoco pudimos encontrar en los animales que habían ingerido dicha ración mayores concentraciones o proporciones molares de ácido acético, cuya síntesis tiende a incrementar la disponibilidad de electrones. De los factores que caracterizan los procesos de fermentación cecocolónicos analizados, sólo la concentración de NH₃ fue especialmente elevada en dicha ración, aunque los autores de la presente memoria no hemos podido obtener información consistente que relacione la disponibilidad de amoníaco en el compartimento de fermentación con un hipotético incremento en las concentraciones absolutas de AMH.

Al expresar la evolución relativa de las AMH en relación al valor registrado de arqueas totales ($2^{-\Delta Ct}$; Livak y Schmittegen, 2001: $AMH(2^{-\Delta Ct})$); dicha relación no difirió, en general, de la evolución registrada con los títulos absolutos (AMH_{Ab}). La proporción de $AMH(2^{-\Delta Ct})$ incrementó con el tránsito del quilo a través del colon y aquellos animales que recibieron la ración con altos niveles de proteína y bajos de fibra mostraron las mayores tasas, siendo estas diferencias más pronunciadas en el colon

medio, con lo cual dicho tratamiento interaccionó del mismo modo que el registrado en sus valores absolutos.

Tal como se ha analizado en el capítulo de revisión, dos serán los sustratos mayoritarios para la síntesis de CH₄, i) a partir del hidrogeno y la realizaran las AMH (hidrogenotróficos o quimiolitioautótrofos), y ii) del acético a partir de las AMA (acetoclásticas o quimioorganoheterótrofo), dentro de este último grupo distinguimos la *Methanosaeta* spp. grupo que se distingue por un crecimiento exclusivo a partir del acetato, por el que muestran una elevada afinidad y además son sensibles a ciertos tóxicos; y la *Methanosarcina* spp. que muestran una menor afinidad por el sustrato, pero que pueden utilizar también H y grupos metilo (aunque en una menor proporción), y son más resistentes a los tóxicos en nuestro caso (AGV, NH₃) (Karakashev *et al.*, 2005). Los títulos de ambas se presentan también en la Tabla 5.4.3.3, analizadas a partir de qPCR cuyo desarrollo metodológico se presenta pormenorizado en el capítulo 4.1.2 de Material y Métodos. La actividad metanogénica “*in vivo*” de las arqueas acetoclásticas ha sido menos estudiada porque su impacto a nivel ruminal es minoritario, sin embargo, es la arquea mayoritaria en los procesos de digestión anaerobia del purín en fermentadores industriales, y los títulos registrados en purín y en los compartimentos digestivos post-gástrico son relevantes (Luo *et al.*, 2012; Miller y Lin, 2002). Por ello en la Tabla 5.4.3.3 se presentan junto a las concentraciones relativas de AMH(2^{-ΔCt}) dos especies de AMA(2^{-ΔCt}), la *Methanosarcina* spp. y *Methanosaeta*. La concentración relativa de *Methanosaeta* en el ciego fue superior a la registrada con AMH (0,06789 vs 11,09 para AMH(2^{-ΔCt}) y *Methanosaeta*, respectivamente), incrementó de forma significativa durante el tránsito del quilo a través de colon ($P < 0,05$) y dicho incremento fue, relativamente, mayor al registrado con las AMH (1,71 vs 53,91 para AMH(2^{-ΔCt}) y *Methanosaeta*, respectivamente, al final del compartimento de fermentación), no se apreciaron diferencias relacionadas con el contenido de PB o fibra de la ración sobre la concentración relativa de *Methanosaeta*. Tampoco pudo apreciarse una relación positiva entre las concentraciones relativas de *Methanosaeta* y la concentración ceco-colónica de acético, ni se observaron relaciones entre su concentración y la producción de CH₄. En relación al género *Methanosarcina* spp, versátil en relación a la utilización de diferentes sustratos como lo son H₂, acetato, metanol, metilaminas y CO (Cairó y París, 1988), su concentración en el quilo fue minoritaria y su relación con la emisión de CH₄ imperceptible.

Tabla 5.4.3.3. Efecto del nivel de fibra (AF vs NF) y nivel de proteína (AP vs BP), tipo de ración y el lugar de muestreo (ciego, Ci vs colon medio, Co) en cerdos en crecimiento (117,5 d.e. 5,6 kg PV), sobre la concentración en el medio de Bacterias totales (BT), arqueas metanogénicas hidrogenotróficas (AMH (moléculas genes 16S-rRNA/g MF) y la proporción de arqueas metanogénicas hidrogenotróficas AMH [% de las arqueas totales; $\Delta C(t)$] y dos tipos de acetoclásticas, *Methanosaeta* spp. y *Methanosarcina*.

Ítem	Tramo (IG)	APAF	APNF	BPAF	BPNF	PB		FND		†	s.e. PB y FND	P-valor					
						AP	BP	AF	NF			IG	PB	FND	PB×FND	IG×PB	IG×FND
Cuantificación absoluta																	
BT (Nº cop / gMF)	Ci	7,60 ^y	9,19 ^y	10,06 ^y	8,56 ^y	8,39 ^y	9,31 ^y	8,83 ^y	8,88 ^y	1,149	0,812	<,01	0,92	0,52	0,04	0,29	0,43
	Co	23,71 ^x	24,99 ^x	25,41 ^x	21,80 ^x	24,35 ^x	23,60 ^x	24,56 ^x	23,39 ^x								
AMH (Nº cop / gMF)	Ci	2,96 ^y	4,01 ^y	3,55 ^y	3,00 ^y	3,49 ^y	3,28 ^y	3,26 ^y	3,51 ^y	0,603	0,427	<,01	<,01	0,33	0,02	0,02	0,67
	Co	13,28 ^{bx}	15,26 ^{ax}	12,25 ^{bx}	11,49 ^{bx}	14,27 ^{ax}	11,87 ^{bx}	12,76 ^x	13,37 ^x								
Cuantificación relativa																	
AMH[†]	Ci	0,05	0,20 ^y	0,01	0,01	0,13 ^y	0,01	0,03	0,11 ^y	0,572	0,405	<,01	0,01	0,01	0,05	0,02	0,01
	Co	0,84 ^b	4,93 ^{ax}	0,17 ^b	0,93 ^b	2,88 ^{ax}	0,55 ^b	0,50 ^b	2,93 ^{ax}								
<i>Methanosaeta</i>[†]	Ci	14,95 ^y	19,20	7,89	2,33 ^y	17,1 ^y	5,11 ^y	11,42 ^y	10,77 ^y	8,281	5,86	<,01	0,15	0,83	0,80	0,68	0,73
	Co	60,00 ^x	55,20	44,57	55,86 ^x	57,60 ^x	50,22 ^x	53,28 ^x	55,53 ^x								
<i>Methanosarcina</i>[‡]	Ci	4,67	1,75	0,16	2,62	3,21	1,39	2,42	2,18	1,906	1,348	0,19	0,63	0,95	0,29	0,39	0,80
	Co	0,26	0,29	0,33	1,16	0,28	0,75	0,30	0,73								

Superíndice distintos en fila (a, b) indican diferencia significativas en nivel de PB, FND o en la interacción PB x FND x IG, y en columna (y, x) para tramos ($P < 0,05$).

† Interacción PB×FND×IG, todas las interacciones no significativas ($P > 0,05$).

† $2^{(-\Delta C)} \times 10^2$

‡ $2^{(-\Delta C)} \times 10^6$

5.4.3.4. Concentración de bacterias totales y arqueas metanogénicas en el purín.

La población bacteriana y los filotipos de arqueas secuenciados en la fosa de deyecciones están directamente relacionados con los filotipos aislados del ecosistema intestinal (Snell-Castro *et al.*, 2005), sin embargo, los cambios poblacionales que se producen en el tránsito desde el recto a la fosa de deyecciones, con la consiguiente pérdida de las condiciones de fermentación y su mezcla con la orina/agua y restos de alimentos son relevantes. En la Tabla 5.4.3.4 se presenta los títulos absolutos de bacterias totales y AMH, y las concentraciones relativas de AMH y AMA. La concentración de bacterias totales registradas en el colon medio (23,98 s.e. 0,57) disminuyó de forma significativa en la fosa de deyecciones (5,28), la misma evolución se observó en los títulos absolutos de AMH que también se redujeron (13,07 vs 3,10 de forma respectiva en colon y deyecciones), aunque es cierto que existe una cierta homogeneidad en la distribución de los géneros, especialmente en lo que se refiere a arqueas metanogénicas (Whitehead y Cotta, 1999). Las tasas correspondientes a las *Methanosaeta* spp. no sufrieron cambios relevantes.

En Tabla 5.4.3.4 se muestra, además, el efecto del tipo de ración sobre las poblaciones de BT y AMH del purín almacenado en la fosa de deyecciones, efectivamente los títulos registrados estuvieron modificados por los niveles de PB y FND de la ración y ambos factores interaccionaron de forma que el número de copias cuantificadas de BT_{Ab} y AMH_{Ab} fue superior en dietas más fibrosas con un alto contenido en PB (APAF), mientras que los menores títulos se observaron en las deyecciones procedentes de las raciones con las menores proporciones de ambos componentes, PB y FND (NFBP; Tabla 5.4.3.4). No obstante, estas raciones mostraron las concentraciones más altas de AMH_{Ab} pero también de arqueas totales, de forma que la mayor proporción de AMH se observó en las deyecciones de aquellos animales que habían ingerido las raciones con mayores proporciones de PB, pero menores de fibra (0,85 vs 0,29, 0,21 y 0,19 s.e. 0,039 para APNF vs APAF, BPAF y BPNF, respectivamente; $P < 0,05$). Es cierto que en el quilo no se apreció una relación directa entre producción de CH₄ y nº de copias de AMH y este hecho además confirma los resultados de otros autores que no han podido establecer dicha correlación (Morgavi *et al.*, 2010). No obstante, en nuestro caso y en el purín las mayores emisiones de CH₄ se correspondieron con los purines con mayores tasas relativas de AMH procedentes de aquellos animales que habían ingerido una menor cantidad de fibra.

Es posible que en el purín los datos referentes a la emisión de CH₄ estén influenciados por la presencia y actividad de las AMA, y dentro de ellas la *Methanosaeta* spp. (Tabla 5.4.3.4). Al contrario que sucedió con las AMH, su proporción (*Methanosaeta* spp. ($2^{-\Delta C_t}$)) en relación a los valores registrados en el quilo, incrementó, alcanzando mayores valores relativos que las AMH.

Las bajas tasas de *Methanosaeta* spp. en los diferentes compartimentos de fermentación se relacionan con ritmos de crecimiento celular lentos, por debajo de las tasas de renovación del compartimento (Schmidt *et al.*, 2000) y ello implicaría el lavado de dichas especies. Obviamente en la fosa de deyecciones dicha limitación desaparece y efectivamente los títulos de esta especie mejoraron. Elevadas poblaciones o proporciones de *Methanosaeta* spp. dentro de las arqueas totales implicaría que la síntesis de CH₄ se realizaría mayoritariamente a partir del acético y ello podría justificar la ausencia de una relación directa entre títulos de AMH y síntesis de metano. Es necesario señalar que los mayores títulos de *Methanosaeta* spp. se registraron en las deyecciones procedentes de los animales que habían recibido las menores proporciones de FND.

Aunque el valor relativo de las *Methanosarcina* fuese menor que las *Methanosaeta* spp. los incrementos registrados, respecto al quilo, fueron muy variables y en algunos casos superiores y se situaron dos dígitos por encima de los títulos registrados en la digesta del colon. La *Methanosarcina* es más resistente a los tóxicos (i.e. NH₄⁺ y AGV; en este caso y en los digestores) que la *Methanosaeta* spp. y favorecen su crecimiento las elevadas concentraciones de acético. Ambas condiciones que podemos distinguir durante el almacenamiento de las deyecciones y que explicaría los cambios poblacionales entre AMA. En ningún caso se pudo relacionar el crecimiento de las bacterias acetoclásticas con la concentración de acético en el medio.

Tabla 5.4.3.4. Efecto del nivel de fibra (AF vs NF) y nivel de proteína (AP vs BP) de la ración en cerdos en crecimiento (117,5 d.e. 5,6 kg PV) sobre la concentración en el purín de bacterias totales (BT), arqueas metanogénicas hidrogenotróficas (AMH (moléculas genes 16S-rRNA/g MF) y la proporción de arqueas metanogénicas hidrogenotróficas AMH [% de las arqueas totales; $\Delta C(t)$] y dos tipos de acetoclásticas, AMA: *Methanosaeta* spp. y *Methanosarcina*.

Ítems	APAF	APNF	BPAF	BPNF	PB		FND		s.e.		P-valor		
					AP	BP	AF	NF	PB×FND	PB y FND	PB×FND	PB	FND
Cuantificación absoluta													
BT (N° cop / gMF)	6,73 ^a	4,75 ^c	5,20 ^b	4,44 ^d	5,74 ^a	4,82 ^b	5,96 ^a	4,60 ^b	0,029	0,021	<,0001	<,0001	<,0001
AMH (N° cop / gMF)	4,00 ^a	2,96 ^b	3,03 ^b	2,41 ^c	3,48 ^a	2,72 ^b	3,51 ^a	2,69 ^b	0,024	0,017	0,0009	<,0001	<,0001
Cuantificación relativa													
AMH [†]	0,29 ^b	0,85 ^a	0,21 ^b	0,19 ^b	0,57 ^a	0,20 ^b	0,25 ^b	0,52 ^a	0,039	0,027	0,0019	0,0007	0,0024
<i>Methanosaeta</i> [†]	54,2 ^{ab}	33,6 ^b	43,8 ^b	86,5 ^a	43,9 ^b	64,6 ^a	49,0	59,5	5,63	3,98	0,0052	0,02	0,135
<i>Methanosarcina</i> [‡]	0,002 ^b	0,24 ^b	5,10 ^a	0,005 ^b	0,12 ^b	2,59 ^a	2,59 ^a	0,122 ^b	0,457	0,323	0,004	0,006	0,006

Superíndice distintos en fila (a, b, c, d) indican diferencia significativas en nivel de PB, FND o en la interacción PB x FND ($P < 0,05$).

[†] $2^{(-\Delta C)} \times 10^2$

[‡] $2^{(-\Delta C)} \times 10^6$

5.4.4. Evaluación del potencial de producción de metano de heces y el purín.

El último objetivo abordado en este experimento fue el de determinar el efecto de la PB y fibra de la ración sobre la producción potencial de CH₄. Para ello en la sección 4.1.2 de la presente memoria se materializó la puesta a punto del procedimiento *in vitro* basado en la técnica de Theodorou *et al.* (1994), mediante la cual se estimaba la producción de metano cuando el sustrato era digerido anaeróbicamente hasta alcanzar la metanización total del sustrato. En el mismo apartado se evaluó temporalmente este proceso incubando las muestras de purín a 56 días, y se modelizó a partir del modelo propuesto por Gompertz, aplicado a la evolución temporal en la producción de metano del purín (Lay *et al.*, 1997) para estimar la producción potencial de CH₄ cuando no se haya alcanzado la metanización total del sustrato. Una alternativa al modelo propuesto podría consistir en estimar la eficacia del modelo propuesto como predictor de la producción potencial de CH₄ cuando el sustrato (purín) fuese incubado alternativo a periodos de incubación más cortos al propuesto en el citado ensayo (56 días). Con este objetivo se obtuvieron las correspondientes muestras de heces [colección rectal como se describió en el apartado 4.1.2.1] y purín recogido en la fosa, previamente a su vaciado.

Tabla 5.4.4.1. Producción acumulada de metano a 56 días post-incubación del purín artificial construido a partir de heces frescas y orina, junto a los parámetros obtenidos mediante el ajuste del modelo Gompertz a los niveles de producción de CH₄ producido a diferentes periodos.

Ítems	Fase	Proteína (PB)		Fibra (FND)		s.e.	Nivel de significación				
		AP	BP	AF	NF		Fase	PB	FND	PB×Fase	FND×Fase
mL CH ₄ /gMO	FI	6,14	5,22	5,71	5,65	1,198	ns	ns	ns	ns	ns
	FII	7,46	7,18	6,69	7,95						
	FIII	7,51	8,55	8,96	7,10						
B ₀ (ml CH ₄ /gMO)	FI	6,33	5,54	5,93	5,94	1,038	ns	ns	ns	ns	ns
	FII	8,15	7,70	7,67	8,18						
	FIII	8,19	8,88	9,18	7,89						
R (ml CH ₄ /g MO x día)	FI	0,13	0,09 ^y	0,12 ^y	0,10	0,024	ns	ns	T	*	T
	FII	0,15	0,13 ^{xy}	0,13 ^{xy}	0,15						
	FIII	0,16	0,21 ^x	0,22 ^x	0,15						
λ (días)	FI	-18,74	-22,02	-15,08	-25,68	5,670	ns	ns	*	ns	ns
	FII	-7,75	-15,06	-5,46	-17,35						
	FIII	-8,37	-1,59	-3,51	-6,45						

Superíndice distintos en columna (x,y) indican diferencia significativas entre fases ($P < 0,05$).

T, $P > 0,1$; ns, $P > 0,05$; *, $P < 0,05$

En la tabla 5.4.4.1 se presenta la producción de CH₄ cuando el purín artificial fue incubado anaeróbicamente a 56 días, junto a los parámetros estimados a partir del ajuste del modelo de Gompertz a los valores de producción de metano registrados.

El ajuste del modelo a los diferentes niveles de producción de CH₄ fue aceptable, sin embargo, los niveles de CH₄ producidos a los 56 días de incubación fueron muy bajos, inferiores al 10% de los niveles registrados y propuestos en apartado 5.2 de la presente memoria. El purín artificial fue elaborado a partir de las heces de cerdos que recibieron dietas con diferentes niveles de FND y PB, y se realizó aplicando la metodología validada en el segundo ensayo (4.1.2 y 5.2) y por tanto las diferencias registradas deben estar relacionadas con otro tipo de factores metodológicos.

Las heces frescas utilizadas en la puesta a punto del método procedían de cerdas adultas mientras que en este caso procedía de cerdos en crecimiento (11, 16 y 21 semanas de edad), sin duda el ecosistema intestinal de las cerdas adultas puede diferir de la de los animales jóvenes. No obstante, el hecho de que las arqueas metanogénicas colonicen el tracto intestinal a unas edades tempranas parece invalidar esta primera hipótesis.

Una segunda posibilidad radicaría en la conservación de las muestras, efectivamente en la puesta a punto del método se utilizó y procesaron heces frescas. En este experimento, sin embargo, y dada la complicación experimental del ensayo las heces se congelaron (-20 °C) inmediatamente tras su colección para pasados unos meses proceder a su descongelación y utilización. Para ello se descongelaron en nevera (4 °C) previa su digestión *in vitro*.

Probablemente la sensibilidad de las arqueas a los cambios de temperatura fue un factor determinante en el cambio poblacional de las muestras y este sea el principal responsable de los cambios registrados. Una congelación lenta conduce a pérdidas del agua celular, con una concentración de sales a nivel citoplasmático que pueden desnaturalizar las proteínas y deteriorar las membranas (lañez Pajera, 1998). El proceso de descongelación, es otro proceso crucial, y podría actuar incrementando de la misma forma la muerte celular. Los resultados obtenidos con el purín no se diferenciaron del patrón registrado con las heces y que se presenta en la tabla 5.4.4.1. Vistos los resultados obtenidos y su escasa representatividad esta parte del ensayo fue abortada.

VI. CONCLUSIONES

VI. CONCLUSIONES

En el análisis de los resultados obtenidos hemos podido deducir las siguientes conclusiones que se presentan separadas por cada uno de los ensayos realizados:

A partir de los resultados del primer estudio: Estimación directa de la emisión de gases en instalaciones convencionales: Emisión entérica vs emisión de las deyecciones,

Primera: La utilización de módulos estancos (ME) con ventilación controlada y el muestreo continuo del aire a la entrada y la salida permitió cuantificar la emisión amoníaco (NH_3) y metano (CH_4) en condiciones similares a las que se registran en cebaderos comerciales, así al final del cebo (≈ 100 kg PV) los niveles de emisión de NH_3 y CH_4 fueron, respectivamente, de 593,1 y 720,7 mmol/d.

Segunda: El aislamiento de una fracción de la superficie del purín (283 cm^2) mediante la utilización de cámaras de flujo constante (CFC), en la que el flujo de renovación de aire era controlado y muestreado de forma continua, permitió identificar y cuantificar aquella fracción de la emisión de gas que se origina durante el almacenamiento del purín en la fosa de deyecciones, al final del cebo (≈ 100 kg PV) la emisión de NH_3 y CH_4 proveniente de las deyecciones fue de 0,30 y 259,5 mmol/d, respectivamente. Representado dicha fracción el 0,05 y 36% de las emisiones totales registradas en NH_3 y CH_4 , respectivamente.

Tercera: El muestreo continuo del aire a la entrada y salida de los compartimentos y la medida, cada tres horas, de la concentración de los gases objeto del presente estudio nos permitió evaluar las variaciones circadianas en los niveles de emisión.

A partir de los resultados del segundo estudio (Estimación de la capacidad potencial de emisión del purín: emisión de metano)

Primera: Al incubar en anaerobiosis diferentes concentraciones de purín, que variaron entre los 2 y 6 g MS/100 g MF, se produjo la conversión de la MO del purín a metano. La generación de metano se inició tras un periodo de latencia seguido por un periodo de máxima producción [entre los días 14 y 42] tras lo cual las tasas de producción decrecieron progresivamente, de forma que al final del periodo de incubación [día 56] los sustratos utilizables por el consorcio metanogénico habían sido prácticamente fermentados en su totalidad.

Segunda: Entre las concentraciones de purín (g MS/100 g MF) analizadas, fue la concentración intermedia (i.e. 4%) la que mostró una mayor producción de metano y una “metanización” más eficaz de la MO. La dilución o una carga orgánica excesiva limitaron el proceso de fermentación en el purín más diluido (2%) y más concentrado (6%), respectivamente.

Tercera: La utilización de fuentes de carbohidratos de diferente naturaleza como lo son la paja de cereal y las pulpas como sustratos potencialmente activadores del proceso de fermentación del purín mostraron un efecto desigual, dicha suplementación mejoró sensiblemente la producción de CH₄ (295,7 y 361,12 ml/botella) en relación a los valores registrados con el purín sin suplementar (251,8 ml/botella). No obstante, cuando los valores se expresaron por unidad de MO incubada las diferencias se mitigaron sensiblemente (124,2, 132,3 y 138,6 ml CH₄/g MO incubada para el purín sin suplementar o suplementado con paja o la pulpa de manzana).

Cuarta: La utilización de la pulpa de remolacha como co-sustrato para la fermentación del purín incrementó los ritmos de producción de metano en las fases iniciales del proceso de incubación para deprimirlas posteriormente, con un balance al final que mostró menores niveles de producción, en valores absolutos (211,01 vs 251,79) o por unidad de MO incubada (88,48 vs 124,18) en relación a los valores registrados con el purín sin suplementar.

Quinta: La utilización de una fuente exógena de arqueas metanogénicas como lo son las heces frescas de vaca liofilizadas (co-inóculo) no mejoró en ningún caso los niveles de producción de metano (ml/g MO). Si se apreció una ligera mejora en los ritmos de producción, aunque las diferencias en ningún caso alcanzaron relevancia estadística.

Sexta: Con el tiempo de incubación del purín se apreció una reducción manifiesta en los títulos de bacterias totales y arqueas metanogénicas y ello reflejaría la adaptación del ecosistema del purín al medio de incubación. En el medio de incubación la producción de CH₄ se correlacionó negativamente con los títulos de las arqueas metanogénicas, ello que sugiere que sólo algunas especies de arqueas fueron capaces de producir CH₄ en las condiciones de incubación.

Séptima: Los estudios de biodiversidad (DGGE) mostraron, con el periodo de incubación, una rápida adaptación de la comunidad de arqueas al medio de cultivo. La estructura de dicha comunidad fue alterada por la adición de una fuente exógena de arqueas, como lo son las heces frescas de bovino y ello se tradujo en un incremento en las tasas (ml /h) de producción de CH₄.

Octava: El modelo cinético de Gompertz fue el que mostró mayor capacidad de ajuste a los resultados obtenidos en el purín que mostró los niveles máximos de producción de CH₄ (i.e. 4% MS). Los niveles de producción potencial estimados por el modelo fueron algo superiores (15,3 d.e. 6,3%) a los valores de producción acumulada a 56 días de incubación, ello implica que, en dicho periodo aún no se habrían alcanzado los niveles máximos de producción de CH₄ y por tanto no se habría obtenido la metanización completa del sustrato.

A partir de los resultados del tercer estudio: Emisión de NH₃ y GEI en cerdos: fase de transición,

Primera: Al inicio de periodo de transición, en lo que se define como fase, las emisiones de NH₃ y GEI (CH₄ y N₂O) en cerdos de ≈ 22 kg PV alimentados con una ración comercial (16,7 PB y 9,9 FND), en valores absolutos, fueron de 0,42, 3,2 y 0,043 g/d y corregidas para el peso vivo metabólico de 310, 40,8 y 4,2, mg/kgPV^{0,75}/d, respectivamente, para el NH₃, CH₄ y N₂O.

Segunda: En las condiciones descritas durante la fase de transición los niveles de emisión de las deyecciones acumuladas en la fosa, fueron (g/m³ de purín y día) de 0,031, 4,88 y 0 para el NH₃, CH₄, y N₂O, respectivamente. Ello significa que la emisión individual (mg/an/d) fue de 7,1, 1.120 y 0, representando dicha emisión un porcentaje respecto al total del 1,7, 35,0 y 0% de la emisión registrada para NH₃, CH₄ y N₂O, respectivamente. Ello implica que la producción mayoritaria de NH₃ y N₂O se efectuó previa a la llegada de las deyecciones a la fosa.

A partir de los resultados del cuarto estudio: Efecto del nivel de fibra y proteína de la ración sobre los parámetros productivos y la emisión gaseosa en cerdos en cebo,

Primera: A nivel productivo, incrementar el valor biológico de la proteína de la ración mediante la incorporación de aminoácidos esenciales a la ración permitió reducir su contenido en PB sin alterar el rendimiento productivo de los animales y ello fue así hasta la undécima semana de edad. También a partir de esta fase, incrementos dietéticos en el contenido de fibra (FND) que impliquen una dilución energética de la ración se reflejan en reducciones en los índices productivos y un excesivo engrasamiento de la canal.

Segunda: Al incrementar contenido de fibra (FND) en las raciones con un bajo contenido en PB, no se alteraron los coeficientes de digestibilidad de la proteína, lo que confirmaría la recanalización del urea-urinaria vía excreción fecal con la correspondiente fijación del N ureico urinario en N-proteico fecal. A pesar de las ventajas que conllevan ambos, el incremento en el aporte dietético de fibra (FND) y la

reducción en los niveles de PB, nuestros resultados sugieren que ambos factores no deben ser modificados simultáneamente.

Tercera: Los niveles de emisión de CH₄ mostraron una relación positiva con el desarrollo de los animales, tanto en lo que respecta a los niveles totales (g an/d: 2,5, 3,5 y 7,6 s.e. 0,59) como a la emisión proveniente de las deyecciones (0,08, 0,32 y 1,29 para la Fases I, II y III, respectivamente). La contribución relativa de las deyecciones a la emisión total incrementó también con el desarrollo (3,2%, 9% y 17% registrados en las Fases I, II y III, respectivamente). El hecho de que, al corregir las emisión total por el peso metabólico (kgPV^{0,75}) los niveles de emisión de CH₄ siguieran incrementando, sugiere que dicha respuesta está regulada por los niveles de ingestión, pero también con la maduración del tracto-microflora intestinal.

Cuarta: Los cerdos que recibieron las raciones ricas en fibra (AF) mostraron una mayor fermentación entérica y emisión de CH₄, en términos absolutos (g an/d 5,2 vs 3,8 s.e. 0,48) y relativos (mg kgPV^{0,75}: 234,2 vs 177,7 s.e. 18,02) en relación a aquellos que recibieron las raciones con una menor incorporación de fibra (NF). Las raciones que mostraron una mayor emisión entérica mostraron los menores niveles de emisión en fosa (0,48 y 0,64 s.e. 0,053 para AF y NF, respectivamente). No se apreció ningún tipo de correlación entre ingestión de PB y emisión de CH₄.

Quinta: La emisión de NH₃ incrementó con el desarrollo de los animales, en valores absolutos (g an/d: 1,8, 4,8 y 8,5) o relativos al peso (mg kgPV^{0,75}: 127,5, 209,5 y 262,6), cuya magnitud media para las Fases I, II y III fue de 33, 66 y 102 kg de PV. Las emisión de NH₃ originada en la fosa fue mínima, constituyendo según las fases en 1,21, 0,17 y 0,18% de la emisión total (Fases I, II y III, respectivamente).

Sexta: La emisión total de NH₃ incrementó con el nivel de PB de la ración, en valores absolutos (en g an/d: 6,3 vs 3,8 s.e. 0,31) y relativos (mg/kg PV^{0,75}: 243,2 vs 156,5 s.e. 13,5, para los animales que ingirieron AP y BP, respectivamente). Considerando como pérdidas irreversibles de N aquella fracción (%) del N ingerido emitido en forma de N-NH₃, estas pérdidas incrementaron con la edad (6,4, 12,1 y 19,1 mgNH₃/gPBI para FI, II y III) y el nivel de proteína de la ración (13,8 y 11,2 mgNH₃/gPBI para los animales que ingirieron AP y BP, respectivamente). El nivel de fibra de la ración no alteró los niveles de emisión de NH₃.

Séptima: La emisión media individual de N₂O fue en valores absolutos de $\approx 0,46$ g/d o en valores relativos al peso metabólico de ≈ 14 mg/kg PV^{0,75}. Los niveles de emisión incrementaron con el peso de los animales (mg/kg PV^{0,75}: 4,35, 10,48 y 27,12 para FI, II y III, respectivamente) y el N₂O originado en la fosa de deyecciones fue irrelevante (0,92%, 0,3% y 0,05% del N₂O emitido en las Fases I, II y III, respectivamente). Las variaciones en la composición de proteína y fibra de la ración tuvieron un escaso o nulo efecto sobre la emisión de N₂O y sólo las raciones con mayor proporción de fibra ingeridas por aquellos animales con una mayor capacidad de ingestión (FIII) mostraron un incremento en los niveles de emisión de N₂O cuando estas se expresaron por kg de peso metabólico.

Octava: Los valores medios de pH (6,0 y 6,3) y NH₃ (69,7 y 156,3 mg/L) incrementaron durante el tránsito de la digesta en el intestino grueso (IG: ciego-colon) y la concentración de AGV se redujeron (175,2 y 141,1 mM), sin embargo, la respuesta fue modulada por el nivel de PB y FND de la ración.

Novena: Las concentraciones absolutas de BT_{Ab} y AMH_{Ab}, y las proporciones relativas de AMH y el género *Methanosaeta* en el quilo incrementaron a su paso por el IG, aunque los títulos de ambos grupos de poblaciones (los títulos de BT_{Ab} y AMH_{Ab}) estuvieron influenciados por componentes de la dieta. Efectivamente se observó una interacción entre el nivel de PB y FND de la ración y los mayores títulos de ambas poblaciones se registraron con las ración con un alto contenido en proteína y bajo en FND.

VII. BIBLIOGRAFÍA

VII. BIBLIOGRAFÍA.

- Aarnink, A. J. A., A. J. van den Berg, A. Keen, P. Hoeksma, and M. W. A. Verstegen. 1996. Effect of slatted floor area on ammonia emission and on the excretory and lying behaviour of growing pigs. *J. Agr. Engng. Res.* 64: 299-310.
- Aarnink, A. J. A., and M. W. A. Verstegen. 2007. Nutrition, key factor to reduce environmental load from pig production. *Livest. Sci.* 109: 194-203.
- Aarnink, A., A. Sutton, T. Cahn, M. Verstegen, and D. Langhout. 1998. Dietary factors affecting ammonia and odour release from pig manure. In: *Biotechnology in the feed industry. Proceedings of the Alltech's 14th Annual Symposium.* Nottingham University Press, Nottingham. p 45-59.
- Abecia, L., J. Balcells, M. Fondevila, A. Belenguer, G. Holtrop, and G. E. Lobley. 2008. Contribution of gut microbial lysine to liver and milk amino acids in lactating does. *Brit. J. Nutr.* 100: 977-983.
- ADAS. 2007. Nitrates Consultation Supporting Paper F2 – Nitrogen output of livestock excreta. <http://archive.defra.gov.uk/environment/quality/water/waterquality/diffuse/nitrate/documents/consultation-supportdocs/f2-excreta-n-output.pdf> Accessed 3/07 2014.
- Agostini, P. S. 2013. Caracterización e influencia de los factores de producción en el cebo de cerdos en condiciones comerciales. PhD Tesis, Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra.
- Ahlgimm, H., and J. Breford. 1998. Methanemissionen aus der Schweinemast (Methane emissions from fattening pigs). *Landbauforsch. Völk.* 1: 26-34.
- Ahring, B. K. 2003. Perspectives for anaerobic digestion. In: T. Scheper (ed.) *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology No. 81.* p 1-30. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg.
- Alkaya, E., and G. N. Demirer. 2011. Anaerobic mesophilic co-digestion of sugar-beet processing wastewater and beet-pulp in batch reactors. *Renew. Energy.* 36: 971-975.
- Alvarez-Rodriguez, J., B. Hermida, J. Parera, H. Morazán, J. Balcells, and D. Babot. 2013. The influence of drinker device on water use and fertiliser value of slurry from growing-finishing pigs. *Anim. Prod. Sci.* 53: 328-334.
- AMCA. 1990. Field performance measurement of fan systems. AMCA Publication 203-90, Arlington Heights, Ill.
- American Public Health Association, American Water Works Association, and Water Environment Federation (APHA, AWWA and WEF) 1995. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* 19 ed. American Public Health Association. Washington, DC.
- Amon, B. V. Kryvoruchko, M. Fröhlich, T. Amon, A. Pöllinger, I. Mösenbacher, and A. Hausleitner. 2007. Ammonia and greenhouse gas emissions from a straw flow system for fattening pigs: Housing and manure storage. *Livest. Sci.* 112: 199-207.
- Amon, B., A. Pöllinger, V. Kryvoruchko, I. Mösenbacher, A. Hausleitner, and T. Amon. 2005. Ammonia and greenhouse gas emissions from a straw flow system for fattening pigs. In: *Proceedings of the 11th International Conference on the FAO SCORENA Network on Recycling of Agricultural, Municipal and Industrial Residues in Agriculture,* Murcia, Spain. p 273-276.
- Amon, B., V. Kryvoruchko, T. Amon, and G. Moitzi. 2004. Ammonia, methane and nitrous oxide emission during storage of cattle and pig slurry and influence of slurry additive "Effective Micro-Organisms (EM)": final report on Behalf of Multikraft Gesellschaft mbH, Haiding. 1871-1413, University of Natural Resources and Applied Life Sciences, Department of Sustainable Agricultural Systems, Vienna.
- Angenent, L. T., S. Sung, and L. Raskin. 2002. Methanogenic population dynamics during startup of a full-scale anaerobic sequencing batch reactor treating swine waste. *Water Res.* 36: 4648-4654.
- Anguita, M., N. Canibe, J. F. Pérez, and B. B. Jensen. 2006. Influence of the amount of dietary fiber on the available energy from hindgut fermentation in growing pigs: Use of cannulated pigs and *in vitro* fermentation. *J. Anim. Sci.* 84: 2766-2778.

- AOAC. 1990. Official methods of analysis 15 ed. Assoc. Off. Anal. Chem., Arlington, VA. USA.
- AOAC. 2005. Official methods of analysis 18 ed. W. Horwitz and G.W. Latimer (eds). Assoc. Off. Anal. Chem, Gaithersburg, MA, US.
- Arriaga, H., G. Salcedo, S. Calsamiglia, and P. Merino. 2010. Effect of diet manipulation in dairy cow N balance and nitrogen oxides emissions from grasslands in northern Spain. *Agr. Ecosyst. Environ.* 135: 132-139.
- Asociación de Empresas para el Desimpacto Ambiental de los Purines (ADAP). 2014. Los purines y su impacto. <http://www.adap.org.es/quienessomos/los-purines-y-su-impacto/> Acceso 27/02 2014.
- Atakora, J. K., S. Moehn, and R. O. Ball. 2011. Enteric methane produced by finisher pigs is affected by dietary crude protein content of barley grain based, but not by corn based, diets. *Anim. Feed Sci. Tech.* 166: 412-421.
- Babot, D., and M. Revuelta. 2009. Necesidades funcionales. In: F. Forcada, D. Babot, A. Vidal and C. Buxadé (eds.) *Ganado Porcino: Diseño de alojamientos e instalaciones.* p 417. SERVET, Zaragoza.
- Babot, D., B. Hermida, J. Balcells, S. Calvet, and J. Álvarez-Rodríguez. 2011. Technological innovations on swine manure in Southern Europe. *R. Bras. Zootec.* No. 40. p 334-343.
- Bach Knudsen, K. 2010. Características químicas y valor nutritivo de la fibra para ganado porcino. In: FEDNA (ed.) *XXVI Curso de Especialización de FEDNA.* p 153-172, Madrid.
- Bach Knudsen, K. E., and I. Hansen. 1991. Gastrointestinal implications in pigs of wheat and oat fractions. *Brit. J. Nutr.* 65: 217-232.
- Baggs, E., and L. Philippot. 2010. Microbial terrestrial pathways to nitrous oxide. In: K. A. Smith (ed.) *Nitrous oxide and climate change.* p 4-35. Earthscan, London, Washington, DC.
- Baird, D. M., H. C. McCampbell, and J. R. Allison. 1975. Effect of levels of crude fiber, protein and bulk in diets for finishing hogs. *J. Anim. Sci.* 41: 1039-1047.
- Bakker, G. C. M. 1996. Interaction between carbohydrates and fat in pigs, impact on energy evolution in feeds. PhD Thesis, Wageningen Agricultural University, Wageningen.
- Baldauf, S. L., D. Bhattacharya, J. Cockrill, P. Hugenholtz, J. Pawlowski, and A.G.B. Simpson. 2004. The Tree of Life. An Overview. In: J. Cracraft and M. J. Donoghue (eds.) *Assembling, The tree of life.* p 43-75. Oxford University Press, New York.
- Banhazi, T. M., J. Seedorf, D. L. Rutley, and W. S. Pitchford. 2008. Identification of risk factors for sub-optimal housing conditions in Australian piggeries: Part 1. Study justification and design. *J. Agric. Safety and Health.* 14: 5-20.
- Barredo, M. S., and L. M. Evison. 1991. Effect of propionate toxicity on methanogen-enriched sludge, *Methanobrevibacter smithii*, and *Methanospirillum hungatii* at different pH values. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 1764-1769.
- Beaulieu, A. D., N. H. Williams, and J. F. Patience. 2009. Response to dietary digestible energy concentration in growing pigs fed cereal grain-based diets. *J. Anim. Sci.* 87: 965-976.
- Bedford, M. R. 1995. Mechanism of action and potential environmental benefits from the use of feed enzymes. *Anim. Feed Sci. Tech.* 53: 145-155.
- Belenguer, Á., J. Balcells, J. A. Guada, G. Ronquillo, and M. Decoux. 2004. Protein recycling in rabbits: incorporation of microbial lysine in growing rabbits as a method of measurement. In: *Proceedings - 8th World Rabbit Congress, Puebla, Mexico.* p 752-758.
- Belenguer, Á., J. Balcells, J. A. Guada, M. Decoux, and E. Milne. 2005. Protein recycling in growing rabbits: contribution of microbial lysine to amino acid metabolism. *Brit. J. Nutr.* 94: 763-770.
- Belenguer, A., M. Fondevila, J. Balcells, L. Abecia, M. Lachica, and M. D. Carro. 2011. Methanogenesis in rabbit caecum as affected by the fermentation pattern: *in vitro* and *in vivo* measurements. *World Rabbit Science* 19: 75-83.
- Berg, W., and I. Pazsiczki. 2006. Mitigation of methane emissions during manure storage. *Int. Congr. Ser.* 1293: 213-216.

- Berg, W., R. Brunsch, and I. Pazsiczki. 2006. Greenhouse gas emissions from covered slurry compared with uncovered during storage. *Agr. Ecosyst. Environ.* 112: 129-134.
- Bergman, E. N. 1990. Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. *Physiol. Rev.* 70: 567-590.
- Blanes-Vidal, V., M. N. Hansen, S. Pedersen, and H. B. Rom. 2008. Emissions of ammonia, methane and nitrous oxide from pig houses and slurry: Effects of rooting material, animal activity and ventilation flow. *Agr. Ecosyst. Environ.* 124: 237-244.
- BOE. 2011. Real Decreto 1028/2011, de 15 de julio, por el que se establecen disposiciones de aplicación relativas a la clasificación de las canales de porcino. BOE nº 185, 3 agosto 2011. Sec. I. pp. 87921-87930.
- Boone, D. R., and M. P. Bryant. 1980. Propionate-degrading bacterium, *Syntrophobacter wolinii* sp. nov. gen. nov., from methanogenic ecosystems. *Appl. Environ. Microbiol.* 40: 626-632.
- Botermans, J., G. Gustafsson, K.-H. Jeppsson, N. Brown, and L. Rodhe. 2010. Measures to reduce ammonia emissions in pig production Landskap Trädgård Jordbruk : Rapportserie (1654-5427): 63.
- Bouwman, A. F., D. S. Lee, W. A. H. Asman, F. J. Dentener, K. W. Van Der Hoek, and J. G. J. Olivier. 1997. A global high-resolution emission inventory for ammonia. *Global Biogeochem. Cy.* 11: 561-587.
- Bouwman, L., E. Stehfest, and C. van Kessel. 2010. Nitrous oxide emissions from the nitrogen cycle in arable agriculture: estimation and mitigation. In: K. A. Smith (ed.) *Nitrous oxide and climate change.* p 85-106. Earthscan, London, Washington, DC.
- Braun, R. 2007. Anaerobic digestion: a multi-faceted process for energy, environmental management and rural development. In: P. Ranalli (ed.) *Improvement of crop plants for industrial end uses.* p 335-416. Springer, Bologna.
- Butine, T. J., and J. A. Leedle. 1989. Enumeration of selected anaerobic bacterial groups in cecal and colonic contents of growing-finishing pigs. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 1112-1116.
- Cabaraux, J.-F., F. X. Philippe, M. Laitat, B. Canart, M. Vandenhede, and B. Nicks. 2009. Gaseous emissions from weaned pigs raised on different floor systems. *Agr. Ecosyst. Environ.* 130: 86-92.
- Cairó, J. J., and J. M. París. 1988. Microbiología de la digestión anaerobia, metanogénesis. In: Universidad de Valladolid, Secretariado de publicaciones (ed.) 4^{to} Seminario de depuración anaerobia de aguas residuales. p 41-51, Valladolid.
- Calli, B., B. Mertoglu, B. Inanc, and O. Yenigun. 2005. Community changes during start-up in methanogenic bioreactors exposed to increasing levels of ammonia. *Environ. Technol.* 26: 85-91.
- Calvet, S. 2007. Emisión de amoníaco. In: *Curso Ingeniería Ambiental en la Ganadería Intensiva, Fundación Biodiversidad, Generalitat Valenciana y Unión Europea* (ed). Valencia.
- Cambra-López, M., P. García Rebollar, F. Estellés, and A. Torres. 2008. Estimación de las emisiones de los rumiantes en España: el factor de conversión de metano. *Arch. Zootec.* 57: 89-101.
- Campos, E. 2001. Optimización de la digestión anaerobia de purines de cerdo mediante codigestión con residuos orgánicos de la industria agroalimentaria. PhD Tesis, Universitat de Lleida, Lleida.
- Campos, E., J. Palatsi, and X. Flotats. 1999. Co-digestion of pig slurry and organic wastes from food industry. In: *Proceeding of the II International Symposium on anaerobic digestion of solid waste, Barcelona.* p 192-195.
- Campos, E., M. Almirall, J. Mtnes-Almela, and X. Flotats. 2002. Anaerobic digestion of solid fraction of pig slurry. In: *Proc. of Int. Symposium on Anaerobic Digestion of Solid Wastes. Munich.* p 1-8.
- Campos, E., X. Flotats, A. Casañé, J. Palatsi, and A. Bonmatí. 2000. Anaerobic codigestion of pig slurry with olive bleaching earth. In: RECIFE (ed.) *IV Seminario Latinoamericano de digestión anaerobia.* p 57-60, Brasil.
- Canh, T. T., A. J. A. Aarnink, J. B. Schutte, A. Sutton, D. J. Langhout, and M. W. A. Verstegen. 1998a. Dietary protein affects nitrogen excretion and ammonia emission from slurry of growing-finishing pigs. *Livest. Prod. Sci.* 56: 181-191.

- Canh, T. T., A. J. A. Aarnink, Z. Mroz, A. W. Jongbloed, J. W. Schrama, and M. W. A. Verstegen. 1998b. Influence of electrolyte balance and acidifying calcium salts in the diet of growing-finishing pigs on urinary pH, slurry pH and ammonia volatilisation from slurry. *Livest. Prod. Sci.* 56: 1-13.
- Canh, T. T., A. J. Aarnink, M. W. Verstegen, and J. W. Schrama. 1998c. Influence of dietary factors on the pH and ammonia emission of slurry from growing-finishing pigs. *J. Anim. Sci.* 76: 1123-1130.
- Canh, T. T., A. L. Sutton, A. J. Aarnink, M. W. Verstegen, J. W. Schrama, and G. C. Bakker. 1998d. Dietary carbohydrates alter the fecal composition and pH and the ammonia emission from slurry of growing pigs. *J. Anim. Sci.* 76: 1887-1895.
- Canh, T. T., M. W. Verstegen, A. J. Aarnink, and J. W. Schrama. 1997. Influence of dietary factors on nitrogen partitioning and composition of urine and feces of fattening pigs. *J. Anim. Sci.* 75: 700-706.
- Cao, Z., X. Di Liao, J. B. Liang, Y. B. Wu, and B. Yu. 2012. Diversity of methanogens in the hindgut of grower and finisher pigs. *Afr. J. Biotechnol.* 11: 4949-4955.
- Cao, Z., Y. L. Gong, X. D. Liao, J. B. Liang, B. Yu, and Y. B. Wu. 2013. Effect of dietary fiber on methane production in Chinese Lantang gilts. *Livest. Sci.* 157: 191-199.
- Cardenas, L. M., D. Chadwick, D. Scholefield, R. Fychan, C. L. Marley, R. Jones, R. Bol, R. Well, and A. Vallejo. 2007. The effect of diet manipulation on nitrous oxide and methane emissions from manure application to incubated grassland soils. *Atmos. Environ.* 41: 7096-7107.
- Carpenter, D. A., F. P. O Mara, and J. V. O Doherty. 2004. The effect of dietary crude protein concentration on growth performance, carcass composition and nitrogen excretion in entire grower-finisher pigs. *Irish J. Agr. Food Res.* 43: 227-236.
- Carrillo, L. 2003. Rumen y biogás. In: Universidad Nacional de Salta (ed.) *Microbiología Agrícola*. 150 p.
- Carter, E. A., and R. G. Barr. 2013. Preliminary studies demonstrating acetoclastic methanogenesis in a rat colonic ring model. *Journal of Nutrition and Metabolism* 2013: 540967.
- Cerisuelo, A. P. Ferrer, A. Beccaccia, S. Calvet, M. Cambra-López, F. Estellés, W. Antezana, P. García Rebollar, and C. De Blas. 2014. Fibrous agroindustrial by-products in pig diets: effects on nutrient balance and gas emission. In: 65th Annual Meeting of the European Federation of Animal Science, Copenhagen, Denmark. p 416.
- Cerisuelo, A., A. Torres, M. Lainez, and V. Moset. 2012. Increasing energy and lysine in diets for growing-finishing pigs in hot environmental conditions: Consequences on performance, digestibility, slurry composition, and gas emission. *J. Anim. Sci.* 90: 1489-1498.
- Cervantes-Ramírez, M., V. González-Vizcarra, S. Rodríguez-Rubí, M. Cuca-García, and G. Cromwell. 2001. Pérdida de aminoácidos endógenos en cerdos con niveles variables de consumo de alimento. *Agrociencia*: 707-715.
- Cesaro, G., L. Gallo, L. Carraro, F. Tagliapietra, L. Bünger, and S. Schiavon. 2013. Energy balance estimated from individual measurements of body weight and backfat thickness of heavy pigs of four genetic lines fed different diets. *Agri. Conscep. Sci.* 78: 221-224.
- Chaney, A. L., and E. P. Marbach. 1962. Modified reagents for determination of urea and ammonia. *Clin. Chem.* 8: 130-132.
- Chen, Y., J. J. Cheng, and K. S. Creamer. 2008. Inhibition of anaerobic digestion process: A review. *Bioresour. Technol.* 99: 4044-4064.
- Cheng, Y. F., S. Y. Mao, J. X. Liu, and W. Y. Zhu. 2009. Molecular diversity analysis of rumen methanogenic Archaea from goat in eastern China by DGGE methods using different primer pairs. *Lett. Appl. Microbiol.* 48: 585-592.
- Cherukuri, K. 2012. Quantitative analysis of methanogenic community in anaerobic digesters and its response to freeze drying and exposure to oxygen. MSc Thesis, Marquette University, Milwaukee, Wisconsin.
- Christensen, D. N., K. E. Bach Knudsen, J. Wolstrup, and B. B. Jensen. 1999. Integration of ileum cannulated pigs and *in vitro* fermentation to quantify the effect of diet composition on the amount of

- short-chain fatty acids available from fermentation in the large intestine. *J. Sci. Food Agric.* 79: 755-762.
- Christensen, K., and G. Thorbek. 1987. Methane excretion in the growing pig. *Brit. J. Nutr.* 57: 355-361.
- Clark, O. G., S. Moehn, I. Edeogu, J. Price, and J. Leonard. 2005. Manipulation of dietary protein and nonstarch polysaccharide to control swine manure emissions. *J. Environ. Qual.* 34: 1461-1466.
- Clemens, J., R. Vandr , M. Kaupenjohann, and H. Goldbach. 1997. Ammonia and nitrous oxide emissions after land spreading of slurry as influenced by application technique and dry matter-reduction. II. Short Term Nitrous Oxide Emissions. *J. Plant. Nutr. Soil Sc.* 160: 491-496.
- Coma, J., and J. Bonet. 2004. Producción ganadera y contaminación ambiental. FEDNA (ed.) XX Curso de Especialización FEDNA. p 237-272, Barcelona.
- Conn, K. L., E. Topp, and G. Lazarovits. 2007. Factors influencing the concentration of volatile fatty acids, ammonia, and other nutrients in stored liquid pig manure. *J. Environ. Qual.* 36: 440-447.
- Conn, K. L., M. Tenuta, and G. Lazarovits. 2005. Liquid swine manure can kill *Verticillium dahliae* microsclerotia in soil by volatile fatty acid, nitrous acid, and ammonia toxicity. *Phytopathology* 95: 28-35.
- Costa, A., and M. Guarino. 2009. Definition of yearly emission factor of dust and greenhouse gases through continuous measurements in swine husbandry. *Atmos. Environ.* 43: 1548-1556.
- Cox, G. 1979. General ecology experimental manual. Beijing, Sciences Press. p 120-124.
- Cunningham, J. G., and B. G. Klein. 2007. Textbook of Veterinary Physiology 4 ed. Saunders Elsevier Inc, USA.
- Dubeňová, M., T. Œima, R. Galik, Œ. Mihina, G. Vagač, and Œ. Bođo. 2014. Reduction of nitrous oxide and carbon dioxide in the pig barn piggery by different ventilation system intensities. *Agron. Res.* 12: 207-214.
- Dabert, P., F. Vedrenne, C. Brard, and F. B line. 2008. Microbiological aspects of methane production during pig manure storage. In: 13th Ramiran international conference, Potential for simple technology solutions in organic manure management. Albena, BGR. p 96-99.
- Danilevici, C., M. Iordan, and M. Ni. Valorisation of by-products from food industry, means of effectively protecting the environment. *Ann. Food Sci. and Techn.* 10: 223-227.
- de Vega, A., and D. P. Poppi. 1997. Extent of digestion and rumen condition as factors affecting passage of liquid and digesta particles in sheep. *J. Agr. Sci.* 128: 207-215.
- De Wever, H., S. Mussen, and R. Merckx. 2002. Dynamics of trace gas production following compost and NO₃- amendments to soil at different initial TOC/NO₃- ratios. *Soil Biol. Biochem.* 34: 1583-1591.
- Denman, S. E., N. W. Tomkins, and C. S. McSweeney. 2007. Quantitation and diversity analysis of ruminal methanogenic populations in response to the antimethanogenic compound bromochloromethane. *FEMS Microbiol. Ecol.* 62: 313-322.
- Dentener, F., and P. Crutzen. 1994. A three-dimensional model of the global ammonia cycle. *J. Atmos. Chem.* 19: 331-369.
- Dinuccio, E., W. Berg, and P. Balsari. 2008. Gaseous emissions from the storage of untreated slurries and the fractions obtained after mechanical separation. *Atmos. Environ.* 42: 2448-2459.
- Dong, H., Z. Zhu, B. Shang, G. Kang, H. Zhu, and H. Xin. 2007. Greenhouse gas emissions from swine barns of various production stages in suburban Beijing, China. *Atmos. Environ.* 41: 2391-2399.
- Dourmad, J. Y., and B. S ve. 1997. Consumo, utilización y pérdidas de f sforo y nitrógeno en la producción porcina. La situación en Francia In: FEDNA (ed.) XIII Curso de Especialización FEDNA. p 171-188, Madrid, España.
- Dourmad, J. Y., B. S ve, P. Latimier, S. Boisen, J. Fernandez, C. Van der Peet-Schwering, and A. W. Jongbloed. 1999. Nitrogen consumption, utilisation and losses in pig production in France, The Netherlands and Denmark. *Livest. Prod. Sci.* 58: 261-264.
- Dourmad, J. Y., Y. Henry, D. Bourdon, N. Quiniou, and D. Guillou. 1993. Effect of growth potential and dietary protein input on growth performance, carcass characteristics and nitrogen output in growing-finishing pigs. In: M. W. A. Verstegen, L. A. den Hartog, G. J. M. van Kempen and J. H. M.

- Metz (eds.) Nitrogen flow in pig production and environmental consequences No. 69. p 206-211. EAAP Netherlands.
- Dourmad, J.-Y., and C. Jondreville. 2007. Impact of nutrition on nitrogen, phosphorus, Cu and Zn in pig manure, and on emissions of ammonia and odours. *Livest. Sci.* 112: 192-198.
- Driemer, J., and H. Van den Weghe. 1997. Nitrous oxide emissions during nitrification and denitrification of pig manure. In: *Proceedings of the international symposium on ammonia and odour control from animal production Facilities*. p 6-10.
- Espagnol, S., L. Loyon, F. Guiziou, P. Robin, I. Bossuet, and M. Hassouna. 2008. Measuring gaseous emissions from stored pig slurry. In: *The Eighth International Livestock Symposium, Iles VIII*.
- European Commission. 2003. Reference document on best available techniques for intensive rearing of poultry and pigs integrated pollution prevention and control (IPPC), Seville, Spain.
- European Union. 2010. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for experimental and other scientific purposes. *Official Journal of the European Union L276*: 33.
- European Environment Agency (EEA). 2014. Data on emissions of air pollutants submitted to the LRTAP Convention and copied to EEA and ETC/ACC: Consolidated table for all countries in the NFR09 format. <http://www.eea.europa.eu/data-and-maps/data/national-emissions-reported-to-the-convention-on-long-range-transboundary-air-pollution-lrtap-convention-8> Accessed 3/07 2014.
- Fangmeier, A., A. Hadwiger-Fangmeier, L. Van der Eerden, and H.-J. Jäger. 1994. Effects of atmospheric ammonia on vegetation—a review. *Environ. Pollu.* 86: 43-82.
- FEDNA. 2010. *Tablas de composición y valor nutritivo de alimentos para la fabricación de piensos compuestos*, 3 ed. Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal (FEDNA), Madrid, España.
- FEDNA. 2013. *Necesidades nutricionales para ganado porcino* 2 ed. Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal (FEDNA), Madrid, España.
- Ferket, P., E. Van Heugten, T. Van Kempen, and R. Angel. 2002. Nutritional strategies to reduce environmental emissions from nonruminants. *J. Anim. Sci.* 80: E168-E182.
- Fernández, J. A., H. D. Poulsen, S. Boisen, and H. B. Rom. 1999. Nitrogen and phosphorus consumption, utilisation and losses in pig production: Denmark. *Livest. Prod. Sci.* 58: 225-242.
- Figuroa, J. L., A. J. Lewis, P. S. Miller, R. L. Fischer, R. S. Gómez, and R. M. Diedrichsen. 2002. Nitrogen metabolism and growth performance of gilts fed standard corn-soybean meal diets or low-crude protein, amino acid-supplemented diets. *J. Anim. Sci.* 80: 2911-2919.
- Firestone, M. K., and E. A. Davidson. 1989. Microbiological basis of NO and N₂O production and consumption in soil. In: M. O. Andreae and D. S. Schimel (eds.) *Exchange of trace gases between terrestrial ecosystems and the atmosphere*. p 7-21. John Wiley & Sons.
- Flood, W. 2011. The Methane Misconceptions. *Energy & Environment* 22: 233-240.
- Flotats, X. 2010. Dinámica y modelización de la digestión anaerobia. In: *Curso de producción de biogás y gestión de deyecciones*, Lleida.
- Flotats, X., E. Campos, J. Palatsi, and A. Bonmati. 2001. Digestion anaerobia de purines de cerdo y codigestion con residuos de la industria alimentaria. *Porci; Monografías de Actualidad* 65: 51-65.
- Fondevila, M., and B. Pérez-Espés. 2008. A new *in vitro* system to study the effect of liquid phase turnover and pH on microbial fermentation of concentrate diets for ruminants. *Anim. Feed Sci. Tech.* 144: 196-211.
- Franke-Whittle, I. H., M. Goberna, and H. Insam. 2009. Design and testing of real-time PCR primers for the quantification of *Methanoculleus*, *Methanosarcina*, *Methanothermobacter*, and a group of uncultured methanogens. *Can. J. Microbiol.* 55: 611-616.
- Franz, R., C. R. Soliva, M. Kreuzer, J. Hummel, and M. Clauss. 2011. Methane output of rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) and guinea pigs (*Cavia porcellus*) fed a hay-only diet: Implications for the scaling of methane production with body mass in non-ruminant mammalian herbivores. *Comp. Biochem. Physiol., A: Mol. Integr. Physiol.* 158: 177-181.

- Galassi, G., G. Crovetto, L. Rapetti, and A. Tamburini. 2004. Energy and nitrogen balance in heavy pigs fed different fibre sources. *Livest. Prod. Sci.* 85: 253-262.
- Gang, L. 2002. Catalytic oxidation of ammonia to nitrogen. Technische Universiteit Eindhoven, The Netherlands.
- García, N. U. 2006. Degradación de metacrilatos bajo condiciones anaerobias. MSc Tesis, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa.
- Gerrits, W. J., and M. W. Verstegen. 2006. El papel de la fibra dietética en alimentación porcina. XXII Curso de Especialización FENDA. p 19-35, Barcelona, España.
- Gibson, G., and X. Wang. 1994. Regulatory effects of bifidobacteria on the growth of other colonic bacteria. *J. App. Microbiol.* 77: 412-420.
- Gidenne, T., and N. Jehl. 1996. Replacement of starch by digestible fibre in the feed for the growing rabbit. 1. Consequences for digestibility and rate of passage. *Anim. Feed Sci. Tech.* 61: 183-192.
- Gloaguen, M., N. Le Floc'h, E. Corrent, Y. Primot, and J. van Milgen. 2014. The use of free amino acids allows formulating very low crude protein diets for piglets. *J. Anim. Sci.* 92, 637-644.
- Goff, G. L., L. L. Groumellec, J. Van Milgen, S. Dubois, and J. Noblet. 2002. Digestibility and metabolic utilisation of dietary energy in adult sows: influence of addition and origin of dietary fibre. *Brit. J. Nutr.* 87: 325-335.
- González-Fernández, C., and P. A. García-Encina. 2009. Impact of substrate to inoculum ratio in anaerobic digestion of swine slurry. *Biomass Bioenerg.* 33: 1065-1069.
- Granier, R., N. Guingand, and P. Massabie. 1996. Influence du niveau d'hygrométrie, de la température et du taux de renouvellement de l'air sur l'évolution des teneurs en ammoniac. *Journées Rech. Porcine en France* 28: 209-216.
- Groenestein, C., and H. Van Faassen. 1996. Volatilization of ammonia, nitrous oxide and nitric oxide in deep-litter systems for fattening pigs. *J. Agr. Eng. Res.* 65: 269-274.
- Groot Koerkamp, P. W. G., and H. G. Uenk. 1997. Climatic conditions and aerial pollutants in and emissions from commercial animal production systems in the Netherlands. In: J. A. M. Voermans and G. J. Monteny (eds.) *Proceedings of the international symposium on ammonia and odour control from animal production facilities. Research Station for Pigs Husbandry (PV).* p 139-144, Rosmalen.
- Grupo Gestión Porcina. 2012. Informe del Sector Porcino. In: Generalitat de Catalunya. Departament d'Agricultura, Ramaderia, Pesca, Alimentació i Medi Natural (DAAM). Ejercicio 2011.
- Guarino, M., C. Fabbri, P. Navarotto, L. Valli, G. Mascatelli, M. Rossetti, and V. Mazzotta. 2003. Ammonia, methane and nitrous oxide emissions and particulate matter concentrations in two different buildings for fattening pig. In: *Proceedings of the international symposium on gaseous and odour emissions from animal production facilities, Foulum, Denmark.* p 140-149.
- Gutierrez, N., B. Kerr, and J. Patience. 2013. Effect of insoluble-low fermentable fiber from corn-ethanol distillation origin on energy, fiber, and amino acid digestibility, hindgut degradability of fiber, and growth performance of pigs. *J. Anim. Sci.* 91: 5314-5325.
- Haeussermann, A., E. Hartung, E. Gallmann, and T. Jungbluth. 2006. Influence of season, ventilation strategy, and slurry removal on methane emissions from pig houses. *Agr. Ecosyst. Environ.* 112: 115-121.
- Hallam, S., P. Girguis, C. Preston, P. Richardson, and E. DeLong. 2003. Identification of methyl coenzyme M reductase A (*mcrA*) genes associated with methane-oxidizing archaea. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 5483-5491.
- Hansen, K. H., I. Angelidaki, and B. K. Ahring. 1998. Anaerobic digestion of swine manure: inhibition by ammonia. *Water Res.* 32: 5-12.
- Hansen, M. J., A. Chwalibog, and A.-H. Tauson. 2007. Influence of different fibre sources in diets for growing pigs on chemical composition of faeces and slurry and ammonia emission from slurry. *Anim. Feed Sci. Tech.* 134: 326-336.

- Hansen, M. J., J. V. Nørgaard, A. P. S. Adamsen, and H. D. Poulsen. Effect of reduced crude protein on ammonia, methane, and chemical odorants emitted from pig houses. *Livest. Sci.* (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.livsci.2014.08.017i>
- Hartog, L., and Sijtsma. 2007. Estrategias nutricionales para reducir la contaminación ambiental en la producción de cerdos. FEDNA (ed.) XXIII Curso de Especialización FEDNA. p 19-41, Madrid.
- Heij, G., and T. Schneider. 1995. Dutch priority programme on acidification. Final report third phase additional programme on acidification. RIVM report 300-05.
- Henry, Y., and J. Y. Dourmad. 1993. Feeding strategy for minimizing nitrogen output in pigs In: M. W. A. Verstegen, L. A. den Hartog, G. J. M. van Kempen and J. H. M. Metz (eds.) Nitrogen flow in pig production and environmental consequences No. 69. p 237-150. EAAP Netherlands.
- Hermes, R. G., F. Molist, M. Ywazaki, M. Nofrarias, A. Gomez de Segura, J. Gasa, and J. F. Pérez. 2009. Effect of dietary level of protein and fiber on the productive performance and health status of piglets. *J. Anim. Sci.* 87: 3569-3577.
- Hofman, G., and O. Van Cleemput. 2004. Soil and plant nitrogen. IFA, International Fertilizer Industry Association.
- Höglund-Isaksson, L. 2012. Global anthropogenic methane emissions 2005 - 2030: technical mitigation potentials and costs. *Atmos. Chem. Phys.* 12: 9079-9096.
- Houghton, J. T., L. G. Meira Filho, B. Lim, K. Treanton, I. Mamaty, Y. Bonduki, D.-J. Griggs, and B. A. Callender. 1996. IPCC Revised 1996 guidelines for national greenhouse gas inventories, Reference manual, Chapter 4- Agriculture. IPCC, Bracknell.
- Imbeah, M., and W. C. Sauer. 1991. The effect of dietary level of fat on amino acid digestibilities in soybean meal and canola meal and on rate of passage in growing pigs. *Livest. Prod. Sci.* 29: 227-239.
- IPPC. 2006. Emissions from livestock and manure management. En: 2006 IPCC guidelines for national greenhouse gas inventories. Volume 4. Agriculture, Forestry and Land Use. Kanagawa, Japon, IGES No. 4. p 87.
- IPPC. 2007. Cambio Climático 2007: Informe de síntesis. Contribución de los grupos de trabajo I, II y III al cuarto informe de evaluación del grupo intergubernamental de expertos sobre el cambio climático. IPPC, Ginebra, Suiza.
- Jain, M. K., R. Singh, and P. Tauro. 1982. Biochemical changes during anaerobic digestion of animal wastes. *Water Res.* 16: 411-415.
- Janssen, P. H. 2010. Influence of hydrogen on rumen methane formation and fermentation balances through microbial growth kinetics and fermentation thermodynamics. *Anim. Feed Sci. Tech.* 160: 1-22.
- Jarret, G., A. Cerisuelo, P. Peu, J. Martinez, and J.-Y. Dourmad. 2012. Impact of pig diets with different fibre contents on the composition of excreta and their gaseous emissions and anaerobic digestion. *Agr. Ecosyst. Environ.* 160: 51-58.
- Jarret, G., J. Martinez, and J. Dourmad. 2010. The effect of adding fibre sources to diets on the volatilisation of ammonia and the production of methane from pig effluents. In: 42e Journées Rech. Porcine. p 269-276.
- Jarret, G., J. Martinez, and J.-Y. Dourmad. 2011. Pig feeding strategy coupled with effluent management – fresh or stored slurry, solid phase separation – on methane potential and methane conversion factors during storage. *Atmos. Environ.* 45: 6204-6209.
- Jean-François, S. 2008. The role of the carbon cycle for the greenhouse gas balance of grasslands and of livestock production system. In: Livestock and Global Climate Change, Hammamet, Tunisia. Proceedings of the Brit. Soc. Anim. Prod. p 12-15.
- Jensen, B. B., and H. Jørgensen. 1994. Effect of dietary fiber on microbial activity and microbial gas production in various regions of the gastrointestinal tract of pigs. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 1897-1904.

- Jeppsson, K. 2002. Diurnal variation in ammonia, carbon dioxide and water vapour emission from an uninsulated, deep litter building for growing/finishing pigs. *Biosyst. Eng.* 81: 213-224.
- Jha, R., J. K. Htoo, M. G. Young, E. Beltranena, and R. T. Zijlstra. 2013. Effects of increasing co-product inclusion and reducing dietary protein on growth performance, carcass characteristics, and jowl fatty acid profile of growing–finishing pigs. *J. Anim. Sci.* 91: 2178-2191.
- Ji, Z. Y., Z. Cao, X. D. Liao, Y. B. Wu, J. B. Liang, and B. Yu. 2011. Methane production of growing and finishing pigs in southern China. *Anim. Feed Sci. Tech.* 166: 430-435.
- Jongbloed, A.W., and N. P. Lenis, 1992. Alteration of nutrition as a means to reduce environmental pollution by pigs. *Livest. Prod. Sci.* 31: 75-94.
- Jørgensen, H. 2007. Methane emission by growing pigs and adult sows as influenced by fermentation. *Livest. Sci.* 109: 216-219.
- Jørgensen, H., P. K. Theil, and K. E. B. Knudsen. 2011. Enteric methane emission from pigs. in: E. Carayannis (ed.) *Planet Earth - Global warming challenges and opportunities for policy and practice.* p 605-622. InTech.
- Jørgensen, H., X. Q. Zhao, B.O. and Eggum. 1996. The influence of dietary fibre and environmental temperature on the development of the gastrointestinal tract, digestibility, degree of fermentation in the hind-gut and energy metabolism in pigs. *Br. J. Nutr.* 75, 365–378.
- Jouany, J. P. 1982. Volatile fatty acid and alcohol determination in digestive contents, silage juices, bacterial cultures and anaerobic fermentor contents [microbial fermentation, biological liquids, analytic method using gas-liquid chromatography]. *Sci. Aliment.* 2: 131-144.
- Kaparaju, P., and J. Rintala. 2005. Anaerobic co-digestion of potato tuber and its industrial by-products with pig manure. *Resour. Conserv. Recy.* 43: 175-188.
- Karakashev, D., D. J. Batstone, and I. Angelidaki. 2005. Influence of environmental conditions on methanogenic compositions in anaerobic biogas reactors. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 331-338.
- Kaspar, H. F., and K. Wuhrmann. 1978. Product inhibition in sludge digestion. *Microb. Ecol.* 4: 241-248.
- Kay, R., and P. Lee. 1997. Ammonia emission from pig buildings and characteristics of slurry produced by pigs offered low crude protein diets. In: *Proceedings of the International symposium on ammonia and odour control from animal production facilities, Vinkeloord, The Netherlands.* p 253-260.
- Kerr, B. J., F. K. McKeith, and R. A. Easter. 1995. Effect on performance and carcass characteristics of nursery to finisher pigs fed reduced crude protein, amino acid-supplemented diets. *J. Anim. Sci.* 73: 433-440.
- Kerr, B. J., L. L. Southern, T. D. Bidner, K. G. Friesen, and R. A. Easter. 2003. Influence of dietary protein level, amino acid supplementation, and dietary energy levels on growing-finishing pig performance and carcass composition. *J. Anim. Sci.* 81: 3075-3087.
- Khalil, M. A. K. 2000. Atmospheric methane: an introduction. In: M. A. K. Khalil (ed.) *Atmospheric methane: its role in the global environment.* Springer-Verlag, Berlin.
- Kil, D. Y., F. Ji, L. L. Stewart, R. B. Hinson, A. D. Beaulieu, G. L. Allee, J. F. Patience, J. E. Pettigrew, and H. H. Stein. 2013. Effects of dietary soybean oil on pig growth performance, retention of protein, lipids, and energy, and the net energy of corn in diets fed to growing or finishing pigs. *J. Anim. Sci.* 91: 3283-3290.
- Kim, M., M. Morrison, and Z. Yu. 2011. Status of the phylogenetic diversity census of ruminal microbiomes. *FEMS Microbiol. Ecol.* 76: 49-63.
- Kirchgessner, M., M. Kreuzer, D. A. Roth-Maier, F. Roth, and H. Muller. 1991. Bestimmungsfaktoren der gullecharakteristik beim schwein. Einfluss von futterungsintensitat und den anteil an unverdaulichen sowie an bakteriell fermentierbaren substanzen (bfs) im futter. *Agribiol. Res.* 44: 325-344.
- Kornegay, E., and A. Harper. 1997. Environmental nutrition: Nutrient management strategies to reduce nutrient excretion of swine. *Prof. Ani. Sci.* 13: 99-111.
- Kreuzer, M., and A. Machmuller. 1993. Reduction of gaseous nitrogen emission from pig manure by increasing the level of bacterially fermentable substrates in the ration. In: M. W. A. Verstegen, L. A.

- den Hartog, G. J. M. van Kempen and J. H. M. Metz (eds.) Nitrogen flow in pig production and environmental consequences No. 69. p 151-156. EAAP, Wageningen, The Netherlands.
- Kroeze, C. 1998. N₂O from animal waste. In: A. Freibauer and M. Kaltsmitt (eds.) Proceeding of the workshop on Biogenic Emission of Greenhouse Gases Caused by Arable and Animal Agriculture-Measurement Technology and Emission Factors. p 119-128, University of Stuttgart, Stuttgart.
- Kroeze, C., A. Mosier, and L. Bouwman. 1999. Closing the global N₂O budget: a retrospective analysis 1500–1994. *Global Biogeochem. Cy.* 13: 1-8.
- Laprotex. 2014. Urease – Structural Aspects: Catalytical properties. Monomer, dimer, trimer, hexamer or dodecamer?. <http://www.ufrgs.br/laprotex/en/what-we-do/research-lines/urease-%E2%80%93-structural-aspects/catalytical-properties> Accessed 5/06 2014.
- Latimier, P., and J. Dourmad. 1993. Effect of three protein feeding strategies, for growing-finishing pigs, on growth performance and nitrogen output in the slurry and in the air Nitrogen flow in pig production and environmental consequence. EAAP Publication 69, Netherlands.
- Latorre, M. A., and J. Miana. 2008. Soluciones para los efectos de las altas temperaturas en las explotaciones porcinas. *Universo porcino. Sitio Argentino de Producción Animal*, 6 p.
- Laubach, J., A. Taghizadeh-Toosi, S. J. Gibbs, R. R. Sherlock, F. M. Kelliher, and S. P. P. Grover. 2013. Ammonia emissions from cattle urine and dung excreted on pasture. *Biogeosciences* 10: 327-338.
- Lay, J. J., Y. Y. Li, T. Noike, J. Endo, and S. Ishimoto. 1997. Analysis of environmental factors affecting methane production from high-solids organic waste. *Water Sci. Techn* 36: 493-500.
- Le, P. D., A. J. A. Aarnink, A. W. Jongbloed, C. M. C. Van der Peet-Schwering, N. W. M. Ogink, and M. W. A. Verstegen. 2008. Interactive effects of dietary crude protein and fermentable carbohydrate levels on odour from pig manure. *Livest. Sci.* 114: 48-61.
- Le, P. D., A. J. A. Aarnink, A. W. Jongbloed, C. M. C. Van der Peet-Schwering, N. W. M. Ogink, and M. W. A. Verstegen. 2008a. Content of dietary fermentable protein and odour from pig manure. *Anim. Feed Sci. Tech.* 146: 98-112.
- Le, P., A. Aarnink, and A. Jongbloed. 2009. Odour and ammonia emission from pig manure as affected by dietary crude protein level. *Livest. Sci.* 121: 267-274.
- Lehtomäki, A., S. Huttunen, and J. Rintala. 2007. Laboratory investigations on co-digestion of energy crops and crop residues with cow manure for methane production: effect of crop to manure ratio. *Resour. Conserv. Recy.* 51: 591-609.
- Lekule, F. P., H. Jørgensen, J. Fernández, and A. Just. 1990. Nutritive value of some tropical feedstuffs for pigs. Chemical composition, digestibility and metabolizable energy content. *Anim. Feed Sci. Tech.* 28: 91-101.
- Lelieveld, J., and P. J. Crutzen. 1992. Indirect chemical effects of methane on climate warming. *Nature* 355(6358): 339-342.
- Lelieveld, J., P. J. Crutzen, and F. J. Dentener. 1998. Changing concentration, lifetime and climate forcing of atmospheric methane. *Tellus B.* 50: 128-150.
- Leterme, P. 2001. Las pérdidas endógenas hasta el íleon del cerdo. 1. Origen y factores de variación. *Acta Agronómica (Colombia)*. (2001-2002) 51: 1-14.
- Leterme, P. 2002. Las pérdidas endógenas hasta el íleon del cerdo: origen, factores de variación y métodos de determinación. *Instituto de Investigaciones Porcinas* 9: 6.
- Livak, K. J., and T. D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using Real-Time Quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} Method. *Methods* 25: 402-408.
- Lopez, S., and C. J. Newbold. 2007. Analysis of Methane. In: H. S. Makkar and P. Vercoe (eds.) *Measuring Methane Production From Ruminants*. p 1-13. Springer Netherlands.
- Loyon, L., P. Peu, F. Guiziou, and S. Picard. 2006. Emissions gazeuses de NH₃, N₂O, CH₄, CO₂ au cours du traitement biologique du lisier de porc selon trois modes d'aération. *Journées Rech. Porcine* 38: 49-52.

- Luo, Y.-H., Y. Su, A.-D. G. Wright, L. -I. Zhang, H. Smidt, W.-Y. Zhu. 2012. Lean breed Landrace pigs harbor fecal methanogens at higher diversity and density than obese breed Erhualian pigs. *Archaea* 2012.
- Lynch, M. B., C. J. O'Shea, T. Sweeney, J. J. Callan, and J. V. O'Doherty. 2008. Effect of crude protein concentration and sugar-beet pulp on nutrient digestibility, nitrogen excretion, intestinal fermentation and manure ammonia and odour emissions from finisher pigs. *Animal* 2: 425-434.
- Lynch, M., T. Sweeney, J. Callan, and J. O'Doherty. 2007a. The effect of dietary crude protein concentration and inulin supplementation on nitrogen excretion and intestinal microflora from finisher pigs. *Livest. Sci.* 109: 204-207.
- Lynch, M., T. Sweeney, J. Callan, and J. O'Doherty. 2007b. The effect of dietary barley level on volatile fatty acid concentration and manure ammonia emissions in finishing pigs. *Livest. Sci.* 109: 236-239.
- Madigan, M., J. Martinko, and J. Parker. 2003. *Brock: Biología de los microorganismos*. 10 ed. Pearson, Príncipe Hall, Madrid.
- Madrid, J., S. Martínez, C. López, J. Orengo, M. J. López, and F. Hernández. 2013. Effects of low protein diets on growth performance, carcass traits and ammonia emission of barrows and gilts. *Anim. Prod. Sci.* 53: 146-153.
- Maeda, H., C. Fujimoto, Y. Haruki, T. Maeda, S. Koikeguchi, M. Petelin, H. Arai, I. Tanimoto, F. Nishimura, and S. Takashiba. 2003. Quantitative real-time PCR using TaqMan and SYBR Green for *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, tetQ gene and total bacteria. *FEMS Immunol. Med. Mic.* 39: 81-86.
- Malmlöf, K., and J. Håkansson. 1984. The effect of dietary fibre level on the diurnal pattern of urinary nitrogen excretion in swine. *Swed. J. Agr. Res.* 14.
- MARM. 2010a. Guía de mejores técnicas disponibles del sector porcino. Ministerio de Medio Ambiente, Rural y Marino, Madrid.
- MARM. 2010b. El sector del biogás agroindustrial en España. http://www.magrama.gob.es/es/ganaderia/temas/requisitos-y-condicionantes-de-la-produccion-ganadera/docbiogasversion21-09-2010_tcm7-5925.pdf Acceso 18/06 2014.
- MARM. 2013a. Resultados e informes de ganadería: Encuestas ganaderas 2013, Ganado porcino. http://www.magrama.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas-agrarias/PORCINO_noviembre_2013_tcm7-331599.pdf Acceso 10/03 2014.
- MARM. 2013b. Resultados e informes de ganadería: Encuestas ganaderas 2013, Ganado bovino. http://www.magrama.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas-agrarias/BOVINO_noviembre_2013_tcm7-331597.pdf Acceso 16/06 2014.
- MARM. 2013c. Resultados e informes de ganadería: Ovino-Caprino Noviembre 2013 http://www.magrama.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas-agrarias/OVINO-CAPRINO_noviembre_2013_tcm7-331601.pdf Acceso 18/06 2014.
- Martínez Puig, D. 2006. Implicaciones digestivas y metabólicas del consumo de almidón resistente en el cerdo. PhD Tesis, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona.
- Martínez, M., L. Ayala, and M. Castro. 2004. La fibra en la alimentación del cerdo. *ACPA*. 2: 19-20.
- Massé, D. I., G. Talbot, and Y. Gilbert. 2011. On farm biogas production: A method to reduce GHG emissions and develop more sustainable livestock operations. *Anim. Feed Sci. Tech.* 166-167: 436-445.
- Massé, D., F. Croteau, N. Patni, and L. Masse. 2003. Methane emissions from dairy cow and swine manure slurries stored at 10°C and 15°C. *Can. Biosyst. Eng.* 45: 6.1-6.1.
- Medina, I., J. Álvarez-Rodríguez, A. R. Seradj, H. Morazán, J. Balcalls, and D. Babot. 2013. Efectos del nivel de proteína y fibra de la ración sobre la emisión de gases (NH₃, N₂O y CH₄) en cerdas lactantes. In: AIDA (ed.) XV Jornadas sobre Producción Animal No. 42. p 106-108. AIDA, Zaragoza.

- Mikkelsen, M. H., R. Albrektsen, and S. Gyldenkærne. 2011. Danish emission inventories for agriculture. Inventories 1985 – 2009, National Research Institute, Aarhus University. ERI Technical Report No. 810. 136 pp.
- Miller, T. L., and C. Lin. 2002. Description of *Methanobrevibacter gottschalkii* sp. nov., *Methanobrevibacter thaueri* sp. nov., *Methanobrevibacter woesei* sp. nov. and *Methanobrevibacter wolinii* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microb.* 52: 819-822.
- Møller, H. B., S. G. Sommer, and B. K. Ahring. 2004. biological degradation and greenhouse gas emissions during pre-storage of liquid animal manure. *J. Environ. Qual.* 33: 27-36.
- Monroy, A. O. 1998. Modelamiento y control de un sistema de digestión anaerobia en dos etapas. Tesis PhD, Universidad Nacional Autónoma de México, Coyoacán.
- Montalvo, G., J. Morales, C. Pineiro, S. Godbout, and M. Bigeriego. 2013. Effect of different dietary strategies on gas emissions and growth performance in post-weaned piglets. *Span. J. Agric. Res.* 11: 1016-1027.
- Monteny, G. J. 2004. Environmental impact of meat production: primary production. *Encyclopedia of Meat Sciences.* p 424-429. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.
- Monteny, G. J., C. M. Groenestein, and M. A. Hilhorst. 2001. Interactions and coupling between emissions of methane and nitrous oxide from animal husbandry. *Nutr. Cycl. Agroecosys.* 60: 123-132.
- Monteny, G.-J., A. Bannink, and D. Chadwick. 2006. Greenhouse gas abatement strategies for animal husbandry. *Agr. Ecosyst. Environ.* 112: 163-170.
- Morales, J., J. Pérez, M. Baucells, J. Mourot, and J. Gasa. 2002. Comparative digestibility and lipogenic activity in Landrace and Iberian finishing pigs fed ad libitum corn-and corn-sorghum-acorn-based diets. *Livest. Prod. Sci.* 77: 195-205.
- Morgavi, D., E. Forano, C. Martin, and C. Newbold. 2010. Microbial ecosystem and methanogenesis in ruminants. *Animal* 4: 1024-1036.
- Moset, V. 2009. Estudio de la caracterización y estabilización anaerobia de purín con y sin separación previa de sólido. MSc Tesis, Universidad Politécnica de Valencia, Valencia.
- Moset, V., A. G. Torres, F. Estellés, and A. Cerisuelo. 2010a. Characterization and gas emission from pig slurry with and without solid-liquid separation. In: *International Symposium on Air Quality and Manure Management for Agriculture*, Dallas, Texas.
- Moset, V., L. Torres, A. G. Torres, and A. Cerisuelo. 2010b. Increasing energy and lysine in diets for growing-finishing pigs in hot environments: a preliminary study of the consequences on productive performance, slurry composition and gas emission. In: *International Symposium on Air Quality and Manure Management for Agriculture*, Dallas, Texas.
- Mosier, A.R., C. Kroeze, C. Nivison, O. Oenema, S. Seitzinger, and O. Van Cleemput. 1998. Closing the global N₂O budget: Nitrous oxide emissions through the agricultural nitrogen cycle. *Nutr. Cycl. Agroecosys.* 5: 225-248.
- Moss, A. R., J. P. Jouany, and J. Newbold. 2000. Methane production by ruminants: its contribution to global warming. *Ann. Zootech.* 49: 231-253.
- Nakamura, N. 2010. Comparative analysis of primate hydrogenotrophic microbiota. PhD Thesis, University of Illinois, Urbana-Champaign, Illinois.
- Ndegwa, P., V. Vaddella, A. Hristov, and H. Joo. 2009. Measuring concentrations of ammonia in ambient air or exhaust air stream using acid traps. *J. Environ. Qual.* 38: 647-653.
- Ni, J.-Q., A. J. Heber, T. T. Lim, P. C. Tao, and A. M. Schmidt. 2008. Methane and carbon dioxide emission from two pig finishing barns. *J. Environ. Qual.* 37: 2001-2011.
- Nicks, B., M.Laitat, M. Vandenheede, A. Désiron, C. Verhaeghe, and B. Canart. 2003. Emissions of ammonia, nitrous oxide, methane, carbon dioxide and water vapor in the raising of weaned pigs on straw-based and sawdust-based deep litters. *Anim. Res.* 52: 299-308.
- Noblet, J., and G. Le Goff. 2001. Effect of dietary fibre on the energy value of feeds for pigs. *Anim. Feed Sci. Tech.* 90: 35-52.

- Noblet, J., and X. S. Shi. 1993. Comparative digestibility of energy and nutrients in growing pigs fed ad libitum and adults sows fed at maintenance. *Livest. Prod. Sci.* 34: 137-152.
- NRC. 1998. Nutrient requirements of swine 10 ed. National Academy Press: Washington, DC.
- NRC. 2012. Nutrient Requirements of Swine 11 ed. National Academy Press: Washington, DC.
- Ocepek, M., and D. Škorjanc. 2013. Circadian behavioral patterns and body weight affect ammonia emissions in a pig fattening room. *Agricultura (Slovenia)* 10: 29-35.
- Ocfemia, K., Y. Zhang, and Z. Tan. 2005. Ammonia absorption in a vertical sprayer at low ammonia partial pressures. *Trans. ASAE.* 48: 1561-1566.
- Oenema, O., N. Wrage, G. L. Velthof, J. W. Groenigen, J. Dolfing, and P. J. Kuikman. 2005. Trends in global nitrous oxide emissions from animal production systems. *Nutr. Cycl. Agroecosys.* 72: 51-65.
- Olivier, J., A. Bouwman, K. Van der Hoek, and J. Berdowski. 1998. Global air emission inventories for anthropogenic sources of NO_x, NH₃ and N₂O in 1990. *Environ. Pollut.* 102: 135-148.
- Osada, K., H. B. Rom, and P. Dahl. 1998. Continuous measurement of nitrous oxide and methane emission in pig units by infrared photoacoustic detection. *Trans. ASAE.* 41: 1109-1114.
- Ostrem, K. 2004. Greening waste: Anaerobic digestion for treating the organic municipal wastes. MSc Thesis, Foundation of School of Engineering and Applied Science, Columbia University.
- Øvreås, L., and V. Torsvik. 1998. Microbial diversity and community structure in two different agricultural soil communities. *Microb. Ecol.* 36: 303-315.
- Pahl, O., A. Williams, and R. Sneath. 2002. Reduction of ammonia and odour emissions from pig slurry under slats using oil and foam layers. *Environ. Technol.* 23: 395-403.
- Palatsi, J. 2010a. Anaerobic digestion of slaughterhouse waste. Impact of the LCFA inhibition. PhD Thesis, Universitat de Lleida.
- Palatsi, J. 2010b. Transformación de DQO en metano. Biodegradabilidad. Parámetros ambientales y operacionales. In: Curso de producción de biogás y gestión de deyecciones ganaderas. Universidad de Lleida, Universidad Politécnica de Cataluña, Giro, Gesfer (eds). Lleida
- Pedreira, M., S. G. Oliveira, O. Primavesi, M. A. Lima, R. T. S. Frighetto, and T. T. Berchielli. 2013. Methane emissions and estimates of ruminal fermentation parameters in beef cattle fed different dietary concentrate levels. *R. Bras. Zootec* 42: 592-598.
- Petersen, S. O., K. Regina, A. Pöllinger, E. Rigler, L. Valli, S. Yamulki, M. Esala, C. Fabbri, E. Syväsalö, and F. P. Vinther. 2006. Nitrous oxide emissions from organic and conventional crop rotations in five European countries. *Agr. Ecosyst. Environ.* 112: 200-206.
- Peu, P., H. Brugère, A. M. Pourcher, M. Kérourédan, J. J. Godon, J. P. Delgenès, and P. Dabert. 2006. Dynamics of a pig slurry microbial community during anaerobic storage and management. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 3578-3585.
- Philippe, F.-X., J.-F. Cabaraux, and B. Nicks. 2011b. Ammonia emissions from pig houses: Influencing factors and mitigation techniques. *Agr. Ecosyst. Environ.* 141: 245-260.
- Philippe, F.-X., M. Laitat, B. Canart, M. Vandenheede, and B. Nicks. 2007a. Gaseous emissions during the fattening of pigs kept either on fully slatted floors or on straw flow. *Animal* 1: 1515-1523.
- Philippe, F.-X., M. Laitat, B. Canart, M. Vandenheede, and B. Nicks. 2007b. Comparison of ammonia and greenhouse gas emissions during the fattening of pigs, kept either on fully slatted floor or on deep litter. *Livest. Sci.* 111: 144-152.
- Philippe, F.-X., M. Laitat, J. Wavreille, N. Bartiaux-Thill, B. Nicks, J. -F. Cabaraux. 2011. Ammonia and greenhouse gas emission from group-housed gestating sows depends on floor type. *Agr. Ecosyst. Environ.* 140: 498-505.
- Phillips, V. R., D. D. Covell, R. W. Sneath, T. R. Cumby, A. G. Williams, T. G. M. Demmers, and D. L. Sannards. 1999. An assessment of ways to abate ammonia emissions from UK livestock buildings and waste stores. Part 1: ranking exercise. *Bioresour. Technol.* 70: 143-155.
- Portejoie, S., J. Martinez, F. Guiziou, and C. Coste. 2003. Effect of covering pig slurry stores on the ammonia emission processes. *Bioresour. Technol.* 87: 199-207.

- Portejoie, S., J.-Y. Dourmad, J. Martinez, and Y. Lebreton. 2004. Effect of lowering dietary crude protein on nitrogen excretion, manure composition and ammonia emission from fattening pigs. *Livest. Prod. Sci.* 91: 45-55.
- Poth, M., and D. D. Focht. 1985. ^{15}N kinetic analysis of N_2O production by *Nitrosomonas europaea*: an examination of nitrifier denitrification. *Appl. Environ. Microbiol.* 49: 1134-1141.
- Rademacher, M. 2000. How can diets be modified to minimize the impact of pig production on the environment. *Amino News Special*, vol 1, Number 1, April.
- Ren, T., J. Wang, Q. Chen, F. Zhang, and S. Lu. 2014. The effects of manure and nitrogen fertilizer applications on soil organic carbon and nitrogen in a high-input cropping system. *PLoS one* 9: e97732.
- Roca, M. 2008. Estudio del ecosistema bacteriano del tracto digestivo del cerdo mediante técnicas moleculares. PhD Tesis, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona.
- Roca, M., M. Nofrarias, N. Majó, A. M. Pérez de Rozas, J. Segalés, M. Castillo, S. M. Martín-Orúe, A. Espinal, J. Pujols, and I. Badiola. 2014. Changes in bacterial population of gastrointestinal tract of weaned pigs fed with different additives. *BioMed Res. Int.* 2014, ID269402.
- Rotz, C. 2004. Management to reduce nitrogen losses in animal production. *J. Ani. Sci.* 82: E119-E137.
- Rowe, A. R., B. J. Lazar, R. M. Morris, and R. E. Richardson. 2008. Characterization of the community structure of a dechlorinating mixed culture and comparisons of gene expression in planktonic and biofloc-associated "*Dehalococcoides*" and *Methanospirillum* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 6709-6719.
- Saengkerdsub, S., and S. C. Ricke. 2014. Ecology and characteristics of methanogenic archaea in animals and humans. *Crit. Rev. Microbiol.* 40: 97-116.
- Saha, C. K., G. Zhang, P. Kai, and B. Bjerg. 2010. Effects of a partial pit ventilation system on indoor air quality and ammonia emission from a fattening pig room. *Biosyst. Eng.* 105: 279-287.
- Sahakian, A. B., S.-R. Jee, and M. Pimentel. 2010. Methane and the gastrointestinal tract. *Dig. Dis. Sci.* 55: 2135-2143.
- Samer, M. 2013. Emissions inventory of greenhouse gases and ammonia from livestock housing and manure management. *Agric. Eng. Int: CIGR Journal* 15: 29-54.
- Santianes, J., F. Sánchez, G. Crespo, and S. Fernández. 2009. 17 Informe de vigilancia tecnológica madri+d "Situación actual de la producción de biogás y de su aprovechamiento. Fundación Madri+d para el Conocimiento Madrid.
- Santomá, G. 1997. ¿Máximo de fibra en cerdos en cebo? Factores que influyen sobre el rendimiento de la canal. In: FEDNA (ed.) XIII Curso de Especialización FEDNA. p 100-131, Madrid.
- Satter, L., and L. Slyter. 1974. Effect of ammonia concentration on rumen microbial protein production *in vitro*. *Brit. J. Nutr.* 32: 199-208.
- Schlüter, A., T. Bekel, N. N. Diaz, M. Dondrup, R. Eichenlaub, K. -H. Gartemann, I. Krahn, L. Krause, H. Krömeke, and O. Kruse. 2008. The metagenome of a biogas-producing microbial community of a production-scale biogas plant fermenter analysed by the 454-pyrosequencing technology. *J. Biotechnol.* 136: 77-90.
- Schmidt, J., Z. Mladenovska, M. Lange, and B. Ahring. 2000. Acetate conversion in anaerobic biogas reactors: traditional and molecular tools for studying this important group of anaerobic microorganisms. *Biodegradation* 11: 359-364.
- Scholefield, D., J. M. B. Hawkins, and S. M. Jackson. 1997. Development of a helium atmosphere soil incubation technique for direct measurement of nitrous oxide and dinitrogen fluxes during denitrification. *Soil Biol. Biochem.* 29: 1345-1352.
- Schulze, H., P. Van Leeuwen, M. W. Verstegen, J. Huisman, W. B. Souffrant, and F. Ahrens. 1994. Effect of level of dietary neutral detergent fiber on ileal apparent digestibility and ileal nitrogen losses in pigs. *J. Anim. Sci.* 72: 2362-2368.
- Serena, A., H. Jørgensen, K. B. Knudsen, J. Wiseman, M. A. Varley, S. McOrist, and N. Kemp. 2007. Nutritional value of co-products from vegetable food industry. In: 62nd Easter School in the

- Agricultural and Food Sciences, University of Nottingham, Sutton Bonington Campus, UK. p 473-491.
- Sharma, S., H. Pathak, A. Datta, M. Saxena, T. Saud, and T.K. Mandal. 2011. Study on mixing ratio of atmospheric ammonia and other nitrogen components. *Proc. Int. Acad. Ecol. Environ. Sci.* 1: 26-35.
- Sherlock, R. R., S. G. Sommer, R. Z. Khan, C. Wood, E. A. Guertal, J. R. Freney, C. O. Dawson, and K. C. Cameron. 2002. Ammonia, methane, and nitrous oxide emission from pig slurry applied to a pasture in New Zealand. *J. Environ. Qual.* 31: 1491-1501.
- Shi, X. S., and J. Noblet. 1993. Contribution of the hindgut to digestion of diets in growing pigs and adult sows: effect of diet composition. *Livest. Prod. Sci.* 34: 237-252.
- Shriver, J. A., S. D. Carter, A. L. Sutton, B. T. Richert, B. W. Senne, and L. A. Pettey. 2003. Effects of adding fiber sources to reduced-crude protein, amino acid-supplemented diets on nitrogen excretion, growth performance, and carcass traits of finishing pigs. *J. Anim. Sci.* 81: 492-502.
- SIP Consultors. 2013. Informe INTERPIG 2011 España-Europa: costes de producción y resultado económico comparados. *Avances en Tecnología Porcina* 10 (3): 80-86.
- Smakgahn, K. 2011. Sustainable Water Management for Irrigated Rice Production. In: M. Behnassi, S. A. Shahid and J. D'Silva (eds.) *Sustainable agricultural development: Recent approaches in resources management and environmentally-balanced production enhancement.* p 147-155. Springer, London New York.
- Smith, K., P. J. Crutzen, and A. Mosier. 2010. The global nitrous oxide budget: A Reassessment. In: K. A. Smith (ed.) *Nitrous oxide and climate change.* p 63-84. Earthscan, London, Washington, DC.
- Snell-Castro, R., J.-J. Godon, J.-P. Delgenès, and P. Dabert. 2005. Characterisation of the microbial diversity in a pig manure storage pit using small subunit rDNA sequence analysis. *FEMS Microbiol. Ecol.* 52: 229-242.
- Solomon, S., D. Qin, M. Manning, R. B. Alley, T. Berntsen, N. L. Bindoff, Z. Chen, A. Chidthaisong, J. M. Gregory, G. C. Hegerl, M. Heimann, B. Hewitson, B. J. Hoskins, F. Joos, J. Jouzel, V. Kattsov, U. Lohmann, T. Matsuno, M. Molina, N. Nicholls, J. Overpeck, G. Raga, V. Ramaswamy, J. Ren, M. Rusticucci, R. Somerville, T. F. Stocker, P. Whetton, R. A. Wood, and D. Wratt. 2007. Technical Summary. In: S. Solomon, D. Qin, M. Manning, Z. Chen, M. Marquis, K. B. Averyt, M. Tignor, and H. L. Miller. (eds.) *Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change.* Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA.
- Sommer, S. G., G.-Q. Zhang, A. Bannink, D. Chadwick, T. Misselbrook, R. Harrison, N. J. Hutchings, H. Menzi, G. J. Monteny, and J. Q. Ni. 2006. Algorithms determining ammonia emission from buildings housing cattle and pigs and from manure stores. *Adv. Agron.* 89: 261-335.
- Sommer, S., and H. Møller. 2000. Emission of greenhouse gases during composting of deep litter from pig production – effect of straw content. *J. Agr. Sc.* 134: 327-335.
- Steinfeld, H., P. Gerber, T. D. Wassenaar, V. Castel, M. M. Rosales, and C. de Haan. 2006. *Livestock's long shadow: Environmental issues and options.* Food and Agriculture Organization of the United Nations, Roma.
- Sun, G., H. Guo, and J. Peterson. 2010. Seasonal odor, ammonia, hydrogen sulfide, and carbon dioxide concentrations and emissions from swine grower-finisher rooms. *J. Air Waste Manage.* 60: 471-480.
- Surra, J., J. Guada, J. Balcells, and C. Castrillo. 1997. Renal and salivary clearance of purine derivatives in sheep. *Anim. Sci.* 65: 83-92.
- Sutton, A., K. Kephart, M. Verstegen, T. Canh, and P. Hobbs. 1999. Potential for reduction of odorous compounds in swine manure through diet modification. *J. Ani. Sci.* 77: 430-439.
- 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. *Anim. Feed Sci. Tech.* 48: 185-197.

- Tuitoek, K., L. G. Young, C. F. de Lange, and B. J. Kerr. 1997. The effect of reducing excess dietary amino acids on growing-finishing pig performance: an elevation of the ideal protein concept. *J. Anim. Sci.* 75: 1575-1583.
- UNFCCC. 2005. Cuidar el clima: Guía de la convención marco sobre el cambio climático y el protocolo de kyoto. Secretaría de la Convención Marco sobre el Cambio Climático (CMCC), Bonn.
- UNFCCC. 2007. inventario nacional de emisiones a la atmósfera en base al manual de referencia IPCC y UNFCC. Submission 2007. Spain. CRF 24 April 2007. Inventory 2005. http://unfccc.int/national_reports/annex_i_ghg_inventories/national_inventories_submissions/items/3929.php Acceso 17/06 2014.
- Urriola, P. E., and H. H. Stein. 2012. Comparative digestibility of energy and nutrients in fibrous feed ingredients fed to Meishan and Yorkshire pigs. *J. Anim. Sci.* 90: 802-812.
- Urriola, P. E., S. K. Cervantes-Pahm, and H. H. Stein. 2013. Fiber in swine nutrition. In: I. Lee (ed.) *Sustainable swine nutrition*. p 255-276. Wiley Online Library.
- Urriola, P., and H. Stein. 2010. Effects of distillers dried grains with solubles on amino acid, energy, and fiber digestibility and on hindgut fermentation of dietary fiber in a corn-soybean meal diet fed to growing pigs. *J. Anim. Sci.* 88: 1454-1462.
- Van Amstel, A. R., R. J. Swart, M. S. Krol, J. P. Beck, A. F. Bouwman, and K. W. van der Hoek. 1993. Methane: The other greenhouse gas. Research and policy in the Netherlands. 481507001, Dutch Institute of Human Health and Environmental Hygiene (RIVM), Bilthoven.
- Van der Peet-Schwering, C., A. Aarnink, H. B. Rom, and J. Dourmad. 1999. Ammonia emissions from pig houses in the Netherlands, Denmark and France. *Livest. Prod. Sci.* 58: 265-269.
- Van Kempen, T., and E. van Heugten. 2001. Reducing pig waste and odor through nutritional means. *Livestock and Poultry Environmental Stewardship Plan*, Lesson 10.
- Van Soest, P. J. 1994. *Nutritional ecology of the ruminant*. Cornell University Press.
- Van Soest, P. J., J. B. Robertson, and B. A. Lewis. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74: 3583-3597.
- Varel, V., and J. T. Yen. 1997. Microbial perspective on fiber utilization by swine. *J. Anim. Sci.* 75: 2715-2722.
- Varel, V., I. Robinson, and H. Jung. 1997. Influence of dietary fiber on xylanolytic and cellulolytic bacteria of adult pigs. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 22-26.
- Varel, V., S. Fryda, and I. Robinson. 1984. Cellulolytic bacteria from pig large intestine. *Appl. Environ. Microbiol.* 47: 219-221.
- Vedrenne, F., F. Béline, P. Dabert, and N. Bernet. 2008. The effect of incubation conditions on the laboratory measurement of the methane producing capacity of livestock wastes. *Bioresour. Technol.* 99: 146-155.
- Ward, A. J., P. J. Hobbs, P. J. Holliman, and D. L. Jones. 2008. Optimisation of the anaerobic digestion of agricultural resources. *Bioresour. Technol.* 99: 7928-7940.
- Warren, M. F. 1998. *Financial management for farmers and rural managers*. Blackwell Science Ltd.
- Welford, E., S. Lemay, E. Barber, and S. Godbout. 2003. Simulation of ammonia emissions from swine manure for various diet formulations In: CSAE/SCGR (ed.) No. 03-605, Montréal, Québec.
- Whitehead, T., and M. Cotta. 1999. Phylogenetic diversity of methanogenic archae in swine waste storage pits. *FEMS Microbiol. Lett.* 179: 223-226.
- Williams, A., and E. Nigro. 1997. Covering slurry stores and effects on emissions of ammonia and methane. Ammonia and odour emissions from animal production facilities, Vinkeloord, The Netherlands: 6-8.
- Wood, J. D., N. R. Lambe, G. A. Walling, H. Whitney, S. Jagger, P. J. Fullarton, J. Bayntun, K. Hallett, and L. Bünger. 2013. Effects of low protein diets on pigs with a lean genotype. 1. Carcass composition measured by dissection and muscle fatty acid composition. *Meat Sci.* 95: 123-128.
- World Wildlife Fund (WWF). 2013. Informe de emisiones de Gases de Efecto Invernadero en España 1990-2012.

- [http://awsassets.wwf.es/downloads/informe de emisiones de gei en espana 1990 2012.pdf](http://awsassets.wwf.es/downloads/informe_de_emisiones_de_gei_en_espana_1990_2012.pdf)
Acceso 25/6 2014.
- Worm, P., N. Müller, C. Plugge, A. Stams, and B. Schink. 2010. Syntrophy in methanogenic degradation. In: J. Hackstein (ed.) (Endo) Symbiotic Methanogenic Archaea No. 19. p 143-173. Springer, Münster, Germany.
- Yáñez-Ruiz, D., K. Hart, A. Belanche, A. Martin-Garcia, and C. Newbold. 2007. The effect of protozoa on methane emissions by lambs. In: Proceedings of the Brit. Soc. Anim. Prod. p 47.
- Yáñez-Ruiz, D., K. Hart, A. Martin-Garcia, S. Ramos, and C. Newbold. 2008. Diet composition at weaning affects the rumen microbial population and methane emissions by lambs. *Anim. Prod. Sci.* 48: 186-188.
- Zeeman, G. 1991. Mesophilic and psychrophilic digestion of liquid manure. PhD Thesis, Wageningen Agricultural University, Wageningen.
- Zervas, G., and E. Tsiplakou. 2012. An assessment of GHG emissions from small ruminants in comparison with GHG emissions from large ruminants and monogastric livestock. *Atmos. Environ.* 49: 13-23.
- Zervas, S., and R. T. Zijlstra. 2002. Effects of dietary protein and fermentable fiber on nitrogen excretion patterns and plasma urea in grower pigs. *J. Anim. Sci.* 80: 3247-3256.
- Zhang, Q., X. Zhou, N. Cicek, and M. Tenuta. 2007. Measurement of odour and greenhouse gas emissions in two swine farrowing operations. *Can. Biosyst. Eng.* 49: 6.13-16.20.
- Zhou, M., E. Hernandez-Sanabria, and L. L. Guan. 2010. Characterization of variation in rumen methanogenic communities under different dietary and host feed efficiency conditions, as determined by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 76: 3776-3786.
- Zhou, M., Y. H. Chung, K. A. Beauchemin, L. Holtshausen, M. Oba, T. A. McAllister, and L. L. Guan. 2011. Relationship between rumen methanogens and methane production in dairy cows fed diets supplemented with a feed enzyme additive. *J. App. Microbiol.* 111: 1148-1158.
- Zhu, C. L., M. Rademacher, and C. F. M. de Lange. 2005. Increasing dietary pectin level reduces utilization of digestible threonine intake, but not lysine intake, for body protein deposition in growing pigs. *J. Anim. Sci.* 83: 1044-1053.

VIII. ANEXOS

XIII. ANEXOS

8.1. Comunicaciones en congresos.

Morazán, H., Seradj, A.R., Hermida, B., Álvarez-Rodríguez, J., Babot, D., Balcells, J. 2011. Optimización de los procesos de co-digestión anaerobia de purín de cerdo a partir de subproductos agrícolas como co-sustratos y heces de vacuno como co-inóculo. Asociación Interprofesional para el Desarrollo Agrario, XIV Jornadas sobre producción Animal. Tomo I, 46-48.

Seradj, A.R., **Morazán, H.J.**, Álvarez-Rodríguez, J., Babot, D., Hermida, B., Yañez, D.R., Abecia, L., Balcells, J. 2011. Evolución de la población bacteriana total y metanogénica en el proceso de co-digestión anaerobia de purines de cerdos. Asociación Interprofesional para el Desarrollo Agrario, XIV Jornadas sobre producción Animal. Tomo II, 845-847.

Morazán, H.J., Seradj, A.R., Alvarez, J., Babot, D., Balcells, J. 2012. Estudio de la emisión de GEI (NH₃, CH₄ y N₂O) en ganado porcino: emisión entérica y procedente del almacenamiento de deyecciones". 1^{er} Workshop REMEDIA, Celebrado en Museo Marítimo-Bilbao 8-9 de marzo.

Morazán, H., Contreras, T., Medina, I., Seradj, R., Álvarez, J., Babot, D. y Balcells, J. 2013. Cuantificación de la emisión de CH₄, N₂O y NH₃ en ganado porcino: efecto de los niveles de proteína y fibra de la ración al final del cebo. 2^{do} Workshop REMEDIA, Celebrado en el Campus de Aula Dei (Zaragoza), 11-12 de abril.

Morazán, H., Seradj, A.R., Contreras, D., Medina, I. Álvarez-Rodríguez, J., Babot, D. y Balcells, J. 2013. Cuantificación de la emisión de CH₄, N₂O y NH₃ en ganado porcino: efecto del nivel de proteína y fibra de la ración. Asociación Interprofesional para el Desarrollo Agrario, XV Jornadas sobre producción Animal. Tomo I, 109-111.

Seradj, A.R., **Morazán, H.**, Alvarez-Rodriguez, J., Abecia, L., Babot, D., Yañez-Ruiz, D.R., Balcells, J. 2013. Estudio de la evolución de las poblaciones metanógenas en la digestión anaerobia del purín y su relación con el aporte exógeno de carbohidratos estructurales o arqueas exógenas. Asociación Interprofesional para el Desarrollo Agrario, XV Jornadas sobre producción Animal. Tomo II, 869-871.

8.2. Publicaciones.

Morazán H., Seradj, A.R., Álvarez-Rodríguez J., Abecia, L., Babot, D., Yañez-Ruiz, D., Balcells, J., 2014. Effect of slurry dilution, structural carbohydrates, and exogenous Archaea supply on in vitro anaerobe fermentation and methanogens population of swine slurry. *Environmental Progress & Sustainable Energy*, DOI 10.1002/ep.11952.

Morazán, H., Alvarez-Rodriguez, J., Seradj, A.R., Balcells, J., Babot, D. Trade-offs among growth performance, nutrient digestion and carcass traits when feeding low protein and/or high neutral-detergent fiber diets to growing-finishing pigs. *Journal of Animal Science*. Manuscript ID. E-2014-8344. Submitted 31-Jul-2014.