



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

MÁSTER EN PRODUCCIÓN ANIMAL

**Impacto del Nivel de Grasa y su
Interacción con la Fibra sobre las
Emisiones de Amoniac y Metano en
Purines de Cerdos de Cebo**

Trabajo Fin de Máster

Alumna

Viviana Nathalie Flores Gil

Directoras:

María Cambra López

Alba Cerisuelo García

Valencia, abril 2015

AGRADECIMIENTO

Un agradecimiento muy especial a:

Mis directoras, Alba y María, por su dedicación y tiempo en la realización de este trabajo.

Con todo mi cariño, admiración y respeto como personas y profesionales.
¡Gracias por todo!

Al estado peruano por la financiación de mis estudios de máster: Beca Presidente de la República.

A Pau, Mila, Walter y Alejandro por su amistad y el tiempo compartido en campo y laboratorio.

A los profesores del Máster en Producción Animal, especialmente al profesor Cristòfol Peris. A todos ellos: “gracias por enseñarme a cultivar al hombre y al campo”.

A toda mi familia, ¡gracias!

A mis amigos: Úrsula, Miriam, Lluís, Luis, Elizabeth, Ale, Ernesto, Ave, José, Brenda, Yoa, Mayanna y Nai.

A todos mis compañeros del máster.

Y a todas aquellas personas que de una manera u otra han colaborado con la realización de este trabajo

¡Moltes gràcies!

RESUMEN

Las modificaciones de la dieta en la producción porcina son de suma relevancia frente a la reducción del impacto causado sobre el medio ambiente. El objetivo de este estudio fue valorar el efecto de la inclusión de una fuente de grasa poco digestible (jabones cálcicos de palma) a 3 niveles (0, 3,5 y 7,0%) y su interacción con una fuente de fibra fermentable (pulpa cítrica, CP) en piensos de porcino de cebo sobre las emisiones de amoníaco (NH_3) y metano (CH_4) derivadas de los purines. Asimismo, se pretende cuantificar el volumen y evaluar las características químicas de las deyecciones. Para ello, se utilizaron 30 cerdos machos enteros Pietrain x (Landrace x Largewhite) con un peso inicial de $52,8 \pm 8,5$ kg. Éstos fueron asignados a 5 tratamientos ($n = 6$) en 3 tandas consecutivas. El periodo experimental fue de 21 días: 14 días de adaptación y 7 días de periodo de recogida de muestras. Durante el periodo experimental, se registraron los parámetros productivos y se midió el volumen de las heces, orina y purín producido. Además, se midieron las emisiones potenciales de NH_3 en cámara dinámica a 11 días. También se midió el potencial de producción de CH_4 a 30 días y la producción de CH_4 por animal y día. En general, no se observaron diferencias en los parámetros productivos entre tratamientos. La inclusión de jabón cálcico de palma en los piensos dio lugar a un aumento ($P = 0,002$) del volumen de heces excretado al día. Sin embargo, la inclusión de CP no dio lugar a diferencias en la producción de heces entre tratamientos. La cantidad de orina excretada por los animales y los volúmenes de purín reconstituido no fueron significativamente diferentes entre tratamientos. Un incremento del nivel de jabones cálcicos en los piensos y la adición o no de CP no modificó la composición inicial del purín en términos de sólidos totales, sólidos volátiles y pH. Sin embargo, el incremento de la proporción de jabones cálcicos en los piensos de un 3,5 a un 7% incrementó la concentración de ácidos grasos volátiles, en especial de ácido acético ($P = 0,018$) y propiónico ($P = 0,088$), lo que indica una cierta actividad fermentativa de esta grasa a nivel intestinal. Se observó un efecto negativo ($P < 0,05$) del nivel de grasa

añadida sobre las emisiones de NH_3 por litro de purín. Por otro lado, la inclusión de CP no modificó las emisiones de NH_3 . En relación a las emisiones de CH_4 , un incremento del porcentaje de grasa añadida de 3,5% a 7% incrementó el potencial de producción de CH_4 y la producción de CH_4 por animal y día en 21, 34 mL/g sólidos volátiles añadidos y 70, 27% L/animal y día de media. También, la adición de CP incrementó el potencial de producción de CH_4 a 30 días. En consecuencia, la administración de un pienso con un mayor contenido en grasa parcialmente indigestible en forma de jabón cálcico de palma provocó un aumento en el volumen de heces excretadas y la concentración de ácidos grasos volátiles en las heces. Además, redujo las emisiones de NH_3 e incrementó el potencial de emisiones de CH_4 . Por otro lado, los efectos de la CP en las emisiones de NH_3 parecen depender del nivel de grasa en los piensos y heces. Sin embargo, su inclusión incrementa el potencial de emisión de CH_4 independientemente del nivel de grasa añadida.

RESUM

Les modificacions de la dieta en la producció porcina són de gran rellevància enfront de la reducció de l'impacte causat sobre el medi ambient. L'objectiu d'aquest estudi va ser valorar l'efecte de la inclusió d'una font de greix poc digestible (sabons càlcics de palma) a 3 nivells (0, 3,5 i 7,0%) i la seva interacció amb una font de fibra fermentable (polpa cítrica, CP) en pinsos de porcí d'engreix sobre les emissions de amoníac (NH_3) i metà (CH_4) derivades dels purins. Així mateix, es pretén quantificar el volum i avaluar les característiques químiques de les dejeccions. Per a això, es van utilitzar 30 porcs mascles enters Pietrain x (Landrace x Largewhite) amb un pes inicial de $52,8 \pm 8,5$ kg. Aquests van ser assignats a 5 tractaments ($n = 6$) en 3 tandes consecutives. El període experimental va ser de 21 dies: 14 dies d'adaptació i 7 dies de període de recollida de mostres. Durant el període experimental, es van registrar els paràmetres productius i es va mesurar el volum de les excrements, orina i purí produït. A més, es van mesurar les emissions potencials de NH_3 en cambra dinàmica a 11 dies. També es va mesurar el potencial de producció de CH_4 a 30 dies i la producció de CH_4 per animal i dia. En general, no es van observar diferències en els paràmetres productius entre tractaments. La inclusió de sabó càlcic de palma en els pinsos va donar lloc a un augment ($P = 0,002$) del volum de excrements al dia. No obstant, la inclusió de CP no va donar lloc a diferències en la producció de excrements entre tractaments. La quantitat d'orina excretada pels animals i els volums de purins reconstituït no van ser significativament diferents entre tractaments. Un increment del nivell de sabons càlcics en els pinsos i l'addició o no de CP no va modificar la composició inicial del purí en termes de sòlids totals, sòlids volàtils i pH. No obstant això, l'increment de la proporció de sabons càlcics en els pinsos d'un 3,5 a un 7% va incrementar la concentració d'àcids grassos volàtils, especialment d'àcid acètic ($P = 0,018$) i propiònic ($P = 0,088$), el que indica una certa activitat fermentativa d'aquest greix a nivell intestinal. Es va observar un efecte negatiu ($P < 0,05$) del nivell de greix afegida sobre les emissions de NH_3 per litre de purí.

D'altra banda, la inclusió de CP no va modificar les emissions de NH_3 . En relació a les emissions de CH_4 , un increment del percentatge de greix afegida de 3,5% a 7% va incrementar el potencial de producció de CH_4 i la producció de CH_4 per animal i dia en 21, 34 ml / g sòlids volàtils afegits a i 70, 27% L / animal i dia de mitjana. També, l'addició de CP va incrementar el potencial de producció de CH_4 a 30 dies. En conseqüència, l'administració d'un pinso amb un major contingut en greix parcialment indigestible en forma de sabó càlcic de palma va provocar un augment en el volum d'excrements i la concentració d'àcids grassos volàtils en les excrements. A més, va reduir les emissions de NH_3 i va incrementar el potencial d'emissions de CH_4 . D'altra banda, els efectes de la CP a les emissions de NH_3 semblen dependre del nivell de greix en els pinsos i excrements. No obstant, la seva inclusió incrementa el potencial d'emissió de CH_4 independentment del nivell de greix afegida.

ABSTRACT

Dietary modifications in pig production are of utmost relevance in the reduction of the impact on the environment. The objective of this study was to assess the effect of the inclusion of an unreliable source of digestible fat (palm calcium soaps) at 3 levels (0, 3.5 and 7.0%) and their interaction with a source of fermentable fiber (citrus pulp, CP) in pig feed bait on emissions of ammonia (NH₃) and methane (CH₄) derived from slurry. It also seeks to quantify the volume and evaluate the chemical characteristics of the slurry. For this, 30 boars Pietrain x (Landrace x Largewhite) were used with an initial weight of 52.8 ± 8.5 kg. These were assigned to 5 treatment (n = 6) in 3 consecutive rounds. The experimental period lasted 21 days: 14 days of adaptation and 7 day sampling period. During the experimental period, the production parameters were recorded and the volume of feces, urine and slurry produced was measured. In addition, potential NH₃ emissions were measured in dynamic camera 11 days. Production potential of CH₄ at 30 days and CH₄ production per animal per day was also measured. Overall, no differences in growth performance between treatments. The inclusion of calcium soap of palm feed resulted in an increase (P = 0.002) of the volume of excreted feces daily. However, the inclusion of CP did not result in differences in fecal output between treatments. The amount of urine excreted by the animals and reconstituted slurry volumes were not significantly different between treatments. An increased level of calcium soaps in feed and the addition or not of CP did not change the initial composition of manure in terms of total solids, volatile solids and pH. However, increasing the proportion of calcium soaps in feed from 3.5 to 7% increased the concentration of volatile fatty acids, especially acetic acid (P = 0.018) and propionic acid (P = 0.088), indicating fermentation activity of this fat in the intestine. A negative effect (P <0.05) in the level of added fat on emissions of NH₃ per liter of slurry was observed. Furthermore, the inclusion of not modified CP NH₃ emissions. Regarding CH₄ emissions, an increase in the percentage of added fat from 3.5% to 7% increased the production potential of CH₄ and CH₄ production per animal per

day in 21, 34 mL / g volatile solids added and 70, 27% L / animal per day on average. Also, the addition of CP increased the production potential of CH₄ to 30 days. Accordingly, administration of a feed containing more partially indigestible fat as palm calcium soap caused an increase in the volume of feces and volatile fatty acid concentration in feces. In addition, reduced NH₃ emissions and increased potential for CH₄ emissions. Furthermore, the effect of CP in NH₃ emissions depends on the level of fat in feed and feces. However, its inclusion increases the CH₄ emission regardless of the level of added fat.

ÍNDICE GENERAL

| | | |
|-------|---|----|
| 1 | INTRODUCCIÓN..... | 7 |
| 1.1 | Problema medioambiental del sector porcino: los purines y las emisiones de gases | 7 |
| 1.2 | Estrategias nutricionales para reducir el impacto ambiental de la producción porcina..... | 11 |
| 1.3 | Impacto de la alimentación sobre las emisiones de NH ₃ en porcino | 13 |
| 1.4 | Impacto de la alimentación sobre las emisiones de CH ₄ en porcino | 19 |
| 2 | JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS | 23 |
| 3 | MATERIALES Y MÉTODOS..... | 25 |
| 3.1 | Ubicación del estudio e instalaciones..... | 25 |
| 3.2 | Animales y diseño experimental (fase de campo)..... | 25 |
| 3.3 | Tratamientos | 29 |
| 3.4 | Registros y toma de muestras..... | 30 |
| 3.4.1 | Parámetros productivos..... | 30 |
| 3.4.2 | Toma de muestra para el ensayo de emisiones y reconstitución del purín artificial | 31 |
| 3.5 | Análisis de laboratorio | 32 |
| 3.5.1 | Composición química del purín..... | 32 |
| 3.5.2 | Determinación de pH..... | 32 |
| 3.5.3 | Determinación de ST y SV | 33 |
| 3.5.4 | Determinación de AGV | 35 |
| 3.5.5 | Determinación de NTK | 36 |
| 3.5.6 | Determinación de N-NH ₃ | 38 |

| | | |
|-----|---|----|
| 3.6 | Ensayo de potencial de emisiones de NH_3 | 38 |
| 3.7 | Ensayo de potencial de emisiones de CH_4 | 42 |
| 3.8 | Análisis Estadístico | 47 |
| 4 | RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 48 |
| 4.1 | Datos productivos de los animales..... | 48 |
| 4.2 | Volumen y características químicas iniciales del purín | 51 |
| 4.3 | Emisiones de NH_3 y CH_4 generados por el purín | 54 |
| 5 | CONCLUSIONES | 62 |
| 6 | REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 64 |
| 7 | ANEJOS | 73 |

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Problema medioambiental del sector porcino: los purines y las emisiones de gases

La crianza intensiva de cerdos genera preocupación debido a su potencial contaminante a través de la emisión de gases, polvo, olores y ruido (Zervas y Zijlstra, 2002; Coma y Bonet, 2004 O'Connell *et al.*, 2006), por su asociación con una serie de efectos perjudiciales sobre el medioambiente, la salud pública y el rendimiento de los animales.

El purín constituye el problema medioambiental más importante de la producción porcina, pues contiene una serie de elementos (e.j. nitrógeno (N), fósforo (P) o metales pesados entre otros) que no gestionados adecuadamente pueden causar efectos perjudiciales en el medio acuático, terrestre y aéreo.

Se denomina purín a las deyecciones ganaderas líquidas. Éste está compuesto por heces, orina, agua (de bebida o limpieza), restos de pienso, descamaciones de la piel, pelos, etc. Es decir, se compone principalmente de materia orgánica (MO) y agua (Andres, 2008). En el transcurso del proceso productivo, se le añaden grandes cantidades de agua dando lugar a un contenido en materia seca (MS) de aproximadamente 5% ó menos (Rotz, 2004). Se estima que la composición media de la MO del purín porcino consta de un 25% de carbohidratos biodegradables, 30% de proteína, 10% de grasa y 35% carbohidratos no biodegradables (Sommer y Moller, 2002). Además de MO, éste contiene una serie de elementos minerales como N, P, K, Ca, Mg, Na, Cu, Zn, Fe y Mn, etc. que le confieren un gran valor como fertilizante mineral (Coma y Bonet, 2004). Además, los purines pueden contener elementos no deseados como agentes patógenos, antibióticos y residuos hormonales potencialmente peligrosos para la salud humana, la sanidad animal y el medioambiente (Massé *et al.*, 2010).

Las características químicas del purín son altamente variables y dependen de factores tales como la orientación productiva de la granja (reproductoras, destete, engorde, ciclo cerrado), el sistema de gestión de purines en la explotación, la composición del pienso y su digestibilidad (Lorimor *et al.*, 2000; Andrés, 2008).

El purín, que tradicionalmente ha sido considerado como un subproducto con un elevado potencial de valorización agronómica y energética, se ha convertido en un problema en algunas zonas debido a una concentración de la producción en determinadas áreas geográficas (Coma y Bonet, 2004). Este hecho ha ocasionado que las explotaciones, cada vez más grandes, queden desprovistas de una base territorial suficiente para gestionar dichos subproductos.

En líneas generales, los principales efectos negativos a nivel medioambiental que pueden asociarse a los purines porcinos son:

- ✓ Eutrofización: Generada por un exceso de N y P.
- ✓ Acidificación: Causada por una acumulación de amoníaco (NH_3), óxido de N (NO_x) y compuestos con azufre (S).
- ✓ Emisiones de NH_3 y gases de efecto invernadero (GEI): los principales GEI derivados del purín son el dióxido de carbono (CO_2), metano (CH_4), óxido nitroso (N_2O) (IPPC, 2003).

En las granjas de porcino, el NH_3 es el gas perjudicial más comúnmente generado. Según la Agencia Europea de Medioambiente (2013), en su informe anual sobre el inventario de emisiones 1990-2011, la agricultura supone el 93% de la emisión total de NH_3 en la Unión Europea (UE). Del citado porcentaje, la ganadería representa casi el 70%. Dentro del sector ganadero, el sector porcino contribuye al 15% de las emisiones totales de NH_3 (Sanes, 2014). El NH_3 en forma de gas tiene un fuerte olor, y en concentraciones altas, puede irritar los ojos, garganta y membranas mucosas de personas y animales (Coma y Bonet, 2004). Una vez el gas es emitido a la atmósfera, puede tener una deposición seca (cercana) o húmeda (lejana) en suelos y plantas, pudiendo causar cambios no deseados en

los ecosistemas, como la acidificación del suelo y la eutrofización del agua (Jongbloed *et al.*, 1998; Portejoie *et al.*, 2004).

La eutrofización es un proceso provocado por el enriquecimiento excesivo de nutrientes en el agua, principalmente N y P, que provoca un crecimiento acelerado de las algas o las plantas acuáticas superiores, causando trastornos negativos en el equilibrio de las poblaciones biológicas presentes en el medio acuático y en la propia calidad del agua. Por otro lado, la acidificación de los suelos y aguas se basa en la reacción ácida de distintos compuestos del ambiente al combinarse con el agua que producen variaciones en el pH que afectan a los ecosistemas.

Además, las emisiones de NH_3 representan una pérdida de poder fertilizante del purín. Es por ello, que es necesario entender mejor el proceso de volatilización de NH_3 y conocer su relación con la composición y las características de los purines con el fin de identificar las formas más económicas y prácticas para reducir las emisiones de ese gas (Portejoie *et al.*, 2004).

Las emisiones de NH_3 derivadas del purín se originan, fundamentalmente, a partir del N amoniacal (N-NH_3), que es el principal componente nitrogenado del purín.

En cuanto a los GEI producidos en ganadería, el CH_4 tiene una importancia relevante (Seinfeld y Pandis, 1998). La producción animal es una fuente importante de emisión de GEI en todo el mundo. Diversas fuentes indican que la contribución de la ganadería a las emisiones globales de GEI antropogénico representan entre el 7 y el 18 por ciento de las emisiones totales (Gill *et al.*, 2010; Leip *et al.*, 2010; FAO, 2013; Petersen *et al.*, 2013).

Trabajos recientes han calculado que las emisiones de los GEI provenientes de los cerdos equivalen aproximadamente al 9,5 por ciento del total de las emisiones producidas por el ganado (Gerber *et al.*, 2012; FAO, 2013).

Las dos fuentes más importantes de la emisión de CH_4 en la ganadería son la fermentación entérica y las deyecciones ganaderas (Seinfeld y Pandis 1998). La

fermentación entérica desde el punto de vista de contaminación ambiental adquiere menor relevancia en cerdos puesto que, esta contribución es muy pequeña comparada con la de los rumiantes debido a las diferencias en el sistema digestivo. La cantidad de CH₄ generado por kg de MS es un 5-10% del generado en rumiantes (Coma y Bonet, 2004).

El CH₄, hidrocarburo alcano incoloro, inodoro e insoluble en agua, es una sustancia no polar que se presenta en forma de gas a temperaturas y presiones ordinarias. Del total de GEI, el CH₄ es el segundo mayor contribuyente al calentamiento global. Su potencial de calentamiento sobre la tierra es 23 veces superior al del CO₂. Por ello, en términos de contaminación atmosférica, hay que resaltar el papel del CH₄ procedente de los procesos de producción ganadera sobre el fenómeno global del cambio climático (Seinfeld y Pandis, 1998). En agricultura, el CO₂ no contabiliza como gas de efecto invernadero porque es absorbido y metabolizado por las plantas.

Otro de los GEI procedentes de la actividad ganadera es el N₂O. El potencial de calentamiento de una molécula de N₂O equivale a 310 moléculas de CO₂. Aproximadamente un tercio de las emisiones globales son de origen antropogénico. En España, la agricultura es el sector que contribuye en mayor medida a estas emisiones, siendo responsable de un 75% del total de las emisiones. Del total de las emisiones de agricultura, solo el 10% de éstas se atribuyen a la ganadería, concretamente, a los procesos de gestión de estiércoles y purines (IPCC, 2007; Sanes, 2014).

En la actualidad, el impacto ocasionado por la producción porcina intensiva causa preocupación en la sociedad y ha originado fuertes presiones de grupos ecologistas. Esta gran presión social ha obligado a los gobiernos a establecer una normativa ambiental más precisa respecto al tema de gestión de purines. Ejemplo de ello es la Directiva 96/61/CE de la UE relativa a la prevención y control integrado de la contaminación (IPPC), que regula los índices de emisión a la atmósfera, al agua y al suelo.

Así también, en el marco del Protocolo de Kyoto (1997), los países firmantes, entre ellos España, persiguen una disminución en las emisiones de GEI. Igualmente, en el protocolo de Gotemburgo (1999) se acuerda luchar contra la acidificación, la eutrofización y el ozono troposférico donde se establecen límites máximos de emisión para los contaminantes como el NH₃. En 2012 sufre una actualización, con objetivos que consisten en la reducción de las emisiones en la UE en alrededor el 6% para el NH₃ en comparación con los niveles de 2005 (Sanes, 2014).

1.2 Estrategias nutricionales para reducir el impacto ambiental de la producción porcina

La incorporación de medidas que puedan suponer una mejora en el impacto ambiental del sector porcino se ha convertido en una necesidad para el sector ganadero y, en consecuencia, para el conjunto del sector agrario. Tal es así, que la cuestión medioambiental actualmente es un factor de competitividad en ganadería porque las exigencias sociales así lo están manifestando (Estellés, 2007).

Existe un considerable número de prácticas de mitigación de la contaminación ambiental basadas en los ámbitos de gestión del purín, diseño de los alojamientos, sistemas de producción y alimentación de los animales. Aunque el manejo del purín y las instalaciones ganaderas son un elemento clave en el control de las emisiones, la formulación de los piensos cobra cada vez más importancia como papel promotor o mitigador de las emisiones de gases a partir del purín, debido a su efecto directo sobre la composición de los purines.

Las estrategias nutricionales utilizadas con el objetivo de reducir las emisiones de elementos contaminantes son un conjunto de prácticas dirigidas principalmente a minimizar la cantidad de nutriente no digerido. Por un lado, la elección de los ingredientes en base a su digestibilidad y, por otro, la utilización de aditivos zootécnicos capaces de mejorar la digestibilidad de las raciones, son técnicas que

pueden tener un impacto sobre la contaminación ambiental asociada a la ganadería.

Restringir el uso de insumos para la producción de piensos es otra de las claves para la mitigación de GEI y NH₃. Sobre todo este puede ser un aporte importante en países donde la producción ganadera está muy intensificada (Petersen *et al.*, 2013).

Las modificaciones de la dieta, desde un punto de vista de la sostenibilidad agrícola y perspectiva práctica deben ir a la par con satisfacer los requerimientos nutricionales de los animales y el suministro adecuado de nutrientes de la dieta. La predicción exacta de las necesidades nutricionales de los animales y el control sobre la alimentación, precisa ir de la mano de minimizar el desperdicio de alimento, maximizar la producción y reducir al mínimo las emisiones por unidad de producto animal (Hristov *et al.*, 2013).

Los piensos constituyen la principal entrada de carbono (C) y N en el sistema de producción animal. El fundamento de las medidas nutricionales como método de control de la producción de gases procedentes de purines, se basa en el hecho de que la composición de la dieta es capaz de modificar factores como la utilización de nutrientes y las tasas de fermentación en el intestino grueso, lo que podría afectar a la composición de los purines y, por tanto, a la emisión de gases (Møller *et al.*, 2004; Dinuccio *et al.*, 2008; Moset *et al.*, 2010). También se conoce que una gran cantidad de compuestos encontrados en las deyecciones de porcino (P, K, Cu, Zn) sólo dependen de su proporción en el alimento y de su retención por el tracto digestivo del cerdo (Rigolot *et al.*, 2010).

En consecuencia, las manipulaciones de la dieta que permiten la modificación de la composición del purín o estiércol pueden convertirse en una manera de mitigar las emisiones de NH₃ (Leek *et al.*, 2007) y GEI y aliviar el impacto medioambiental de la producción porcina (Zervas & Zijlstra, 2013). Algunos autores sugieren, que una modificación de la dieta es a la vez una estrategia de mitigación eficaz y posiblemente necesaria para alcanzar los objetivos climáticos a largo plazo (Friel *et al.*, 2009; Westhoek *et al.*, 2011); caso contrario implicaría una limitación severa

en el consumo mundial a largo plazo de los alimentos de origen animal (Cederberg *et al.*, 2012). Sin embargo, existe la necesidad de abordar el cambio climático manteniendo a la par la seguridad alimentaria.

La preocupación por el impacto ambiental de la producción de cerdos ha provocado una intensificación de las investigaciones relacionadas con este tema en un intento de optimizar la alimentación para evitar un exceso de excreción de nutrientes, especialmente aquellos implicados en la generación de NH₃, olor y emisiones de GEI a partir del purín (Canh *et al.*, 1998a; Canh *et al.*, 1998b; Leek *et al.*, 2007; O'Shea *et al.*, 2010). Ejemplo de ello es la puesta en marcha de la guía de Mejores Técnicas Disponibles (MTD's) elaborada por la Comisión Europea (2010). Ésta incluye una lista de técnicas en materia de nutrición con el fin de mitigar las emisiones de GEI y NH₃ originados en granjas de cerdos.

1.3 Impacto de la alimentación sobre las emisiones de NH₃ en porcino

El N, es un elemento esencial en la producción animal. Es un componente primordial de la alimentación para el crecimiento y desarrollo. Sin embargo, la mayor parte del N consumido por los animales es excretado a través de las heces y la orina (Rotz, 2004) produciéndose grandes pérdidas que contribuyen a la degradación del medioambiente.

Los cerdos en la etapa de cebo son responsables del 50 al 64% de las emisiones de NH₃ en las granjas de crianza intensiva (Hayes *et al.*, 2006). Se ha estimado que aproximadamente el 63% de la excreción total de N procede de cerdos en crecimiento, mientras que, el 10 y el 18% proviene de los lechones y cerdos destetados, respectivamente. Es por ello, que el mayor número de investigaciones se centra en esta etapa productiva, ya que es la más significativa en cuanto al porcentaje de contaminación (Hansen *et al.*, 2006). La volatilización del NH₃ se produce en las naves de crianza, en las fosas de almacenamiento del purín y durante y después de la aplicación del estiércol a campo.

En cuanto a la eficiencia de utilización del N por el cerdo de engorde, una gran proporción del N ingerido (60%-70%) es excretado (Jongbloed *et al.*, 1998;

Petersen *et al.*, 2013). Por ello, del total de N suministrado a los cerdos en forma de proteína de la dieta, únicamente entre un 30 y un 40% es retenido por el animal. Éste se elimina por dos rutas: mayoritariamente como urea a través de la orina (N inorgánico), o como compuestos nitrogenados a través de las heces (N orgánico) (Coma y Bonet, 2004). El N ureico (inorgánico) se volatiliza debido a la acción de la ureasa de las heces con mayor rapidez en comparación con el N orgánico de las heces (Cahn *et al.*, 1998a). La pérdida del N inorgánico comienza poco después de la excreción, y continúa a través de todos los procesos de manejo del purín (Rotz, 2004). En cambio, el N fecal se transforma lentamente en N- NH₃ (N orgánico) y su tasa de volatilización es mucho más lenta que en el caso de la urea (Aarnink *et al.*, 2007).

Existen múltiples factores que condicionan la emisión por volatilización del NH₃ en una granja entre ellos la edad del cerdo, la densidad animal, el tipo de cama, las condiciones climáticas (temperatura, humedad relativa, velocidad del aire) y las características del purín (pH y concentración de MS y N- NH₃) (Rotz, 2004; Sommer y Moller, 2002) estas últimas a su vez están influenciadas por la composición de los piensos. También el tipo de almacenamiento del purín (superficie expuesta) y las condiciones durante la aplicación de purín a campo pueden influir en las emisiones de NH₃. (Rotz, 2004; Guía de las MTDs del sector porcino, 2010, Piñeiro y Montalvo, 2005).

En cuanto a la composición del purín, un factor importante que afecta a la pérdida de N es la **concentración de N-NH₃** en el purín. Una mayor concentración de N-NH₃ aumenta el potencial de pérdida total de emisiones de NH₃.

La pérdida de NH₃ es también muy sensible al **pH del purín**. Estas pérdidas son relativamente bajas cuando el pH se encuentra por debajo de 6 y muy altas cuando el pH es superior a 8 (Muck, 1982) En el purín, el ión amonio está en equilibrio con el NH₃. Por tanto, una disminución del pH desplaza el equilibrio hacia el amonio, reduciéndose la formación de NH₃ y su potencial de emisión. Cada disminución de 0,1 puntos de pH puede disminuir la emisión de NH₃ entre un 5 y un 20% (en función de la temperatura) (Coma y Bonet, 2004).

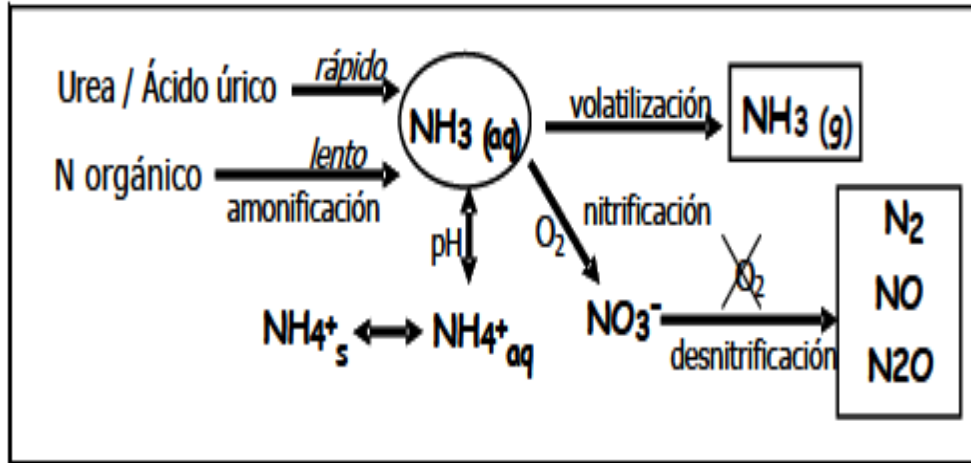


Figura 1: Transformaciones del N excretado por los animales

Fuente: Adaptado de Postage (1990)

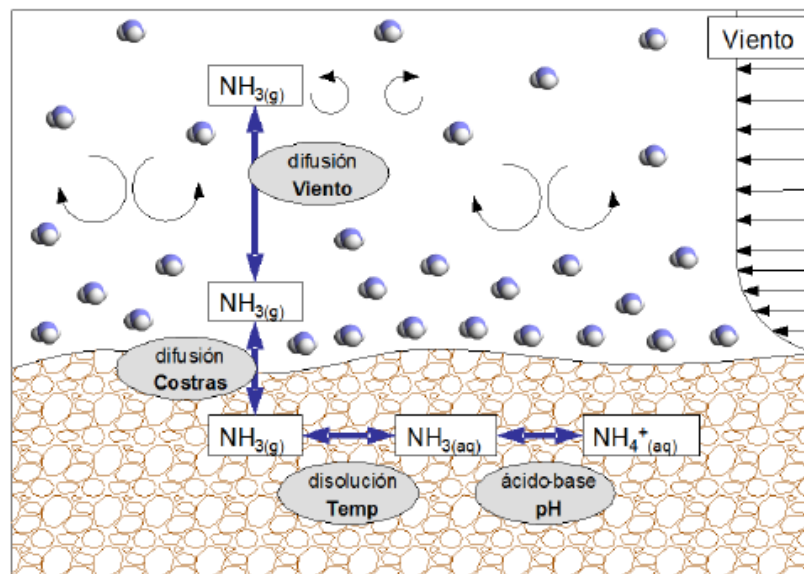


Figura 2: Proceso de volatilización del NH_3 y principales factores implicados.

Fuente: Calvet (2005)

La composición del purín está a su vez fuertemente ligada a la **composición y digestibilidad de las dietas** (Cahn *et al.*, 1998; O'Connell *et al.*, 2006; Leek *et al.*, 2007; Bindelle *et al.*, 2008; Galassi *et al.*, 2010). A continuación se destacan las evidencias científicas más importantes sobre el efecto de las principales fracciones de nutrientes (proteína, carbohidratos y grasas) sobre las emisiones de NH_3 .

En el caso del NH_3 existen numerosas evidencias científicas que indican que la **concentración de proteína bruta** (PB) en los piensos y su calidad (valor biológico) están íntimamente relacionadas con las emisiones de NH_3 . En este sentido, una reducción de la PB en el pienso y una elección adecuada del tipo de proteína en función de su digestibilidad derivará en una reducción de las emisiones de NH_3 . (Zervas & Zijlstra, 2002; Portejoie *et al.*, 2004; O'Connell *et al.*, 2006; Galassi *et al.*, 2010).

Sin embargo, también la **proporción de fibra** en los piensos se ha visto que puede estar ligada a unas menores emisiones de NH_3 . Los resultados de numerosos estudios de investigación (Canh *et al.*, 1998a; Canh *et al.*, 1998b; Zervas & Zijlstra, 2002; Portejoie *et al.*, 2004; Hansen *et al.*, 2006; Bindelle *et al.*, 2008; Halas *et al.*, 2010; Galassi *et al.*, 2010), indican que la inclusión de fuentes de fibra fermentable en los piensos de porcino pueden reducir las emisiones de NH_3 a partir de purines en las granjas porcinas. Según explican estos autores esto puede ser debido a que, a igualdad de N ingerido, la inclusión de este tipo de fibra estimula el crecimiento bacteriano en el intestino grueso (Bindelle *et al.*, 2008) y, provoca una mayor retención de N en forma de N orgánico en heces y, a su vez, una menor absorción de N en sangre y una menor proporción de N ureico en orina, todo ello sin afectar a la excreción total o retención de N (Canh *et al.*, 1998b; Lenis *et al.*, 1999; Zervas & Zijlstra, 2002; Leek *et al.*, 2007; Bindelle *et al.*, 2008). Debido a la estrecha relación positiva entre el N ureico y el NH_3 , este efecto en la excreción de N en orina se ve reflejado en una disminución de las emisiones de NH_3 (Muck, 1982; O'Connell *et al.*, 2006).

La disminución en la emisión de NH_3 se ha reportado cuando se añaden en la dieta fuentes de fibra fermentable como la pulpa de remolacha o la pulpa cítrica, aunque el alcance de la respuesta depende aparentemente del origen de la fibra fermentable (Leek *et al.*, 2007). Sin embargo, evidencias recientes demuestran que no únicamente las fuentes de fibra fermentables sino también las fuentes de fibra más indigestibles son capaces de reducir las emisiones de NH_3 del purín

(Pitarch *et al.*, 2013), aunque se especula que los mecanismos implicados podrían ser diferentes.

Además de afectar a los patrones de excreción de N, la incorporación de fibra fermentable en los piensos puede aumentar la concentración de ácidos grasos volátiles (AGV) en las heces y el purín y reducir, con ello, el pH del purín (Hansen *et al.*, 2006). Debido a la relación entre el pH del purín y el potencial de volatilización del NH_3 comentado anteriormente, esta reducción del pH podría estar implicada en una reducción del potencial de la actividad de la ureasa y la volatilización del NH_3 (Lenis y Jongbloed, 1999). Cahn *et al.* (1998) sugieren la existencia de una relación lineal entre el consumo de polisacáridos no amiláceos (PNA) y las emisiones de NH_3 de manera que por cada 100 g de aumento en la ingesta de PNA el pH de la suspensión se redujo en aproximadamente 0,12 unidades y la emisión de NH_3 disminuyó en un 5,4%.

En definitiva, a través de su doble efecto sobre la repartición del N y el pH del purín, la adición de fibra fermentable en las dietas para cerdos en crecimiento puede ser un método práctico para reducir las emisiones de NH_3 derivadas del purín.

Algunos estudios sugieren un efecto aditivo de la proteína y la fibra fermentable sobre las emisiones de NH_3 . En este sentido, la disminución de la PB y el aumento de los carbohidratos fermentables (como la pulpa de remolacha o la pulpa cítrica) en la dieta de cerdos puede alterar la composición química de las heces y purines disminuyendo las emisiones de NH_3 (Hansen *et al.*, 2006; Gerrits y Verstegen, 2006), generando un efecto aditivo superior al de la manipulación individual de estos dos componentes de la dieta (O'Connell *et al.*, 2006).

Algunos trabajos sugieren que la adición de diferentes tipos de **grasa** en la dieta puede reducir la digestibilidad de algunos nutrientes como la MS, energía y fibra debido a alteraciones de la microbiota intestinal o la limitación de la disponibilidad de sustratos fermentables por parte de la microflora (Cera *et al.*, 1988; Patridge y Gill, 2001). En este sentido, la grasa podría promover la formación de jabones insolubles a nivel intestinal, que no son absorbidos por el animal (Cerisuelo *et al.*,

2012). Por todo ello, es posible que la adición de grasa en los piensos afecte a la composición del purín y, con ello, a las emisiones de gases. Sin embargo, estos efectos dependerán enormemente del nivel y tipo de grasa que se utilice y de su digestibilidad. En este sentido, las grasas saturadas suelen ser menos digestibles que las grasas insaturadas (Dolz, 1996; Michelangeli, 2007; Vilarrasa y Barroeta, 2014).

Los efectos de la adición de grasa en la dieta sobre las emisiones de gases han sido poco estudiados en la literatura. Debido a la naturaleza química de las emisiones de NH_3 , se cree que la descomposición de la grasa, en principio más asociada a una actividad biológica, debe tener poco efecto a nivel de emisiones de NH_3 . Sin embargo, Cerisuelo *et al.* (2012), demostró que la inclusión de manteca como fuente de grasa digestible en piensos de porcino incrementó el rendimiento productivo de los animales y no provocó diferencias en la concentración de grasa del purín. Sin embargo, se observó un aumento de la emisión de NH_3 y otros gases a partir del purín con la adición de manteca debido, probablemente, a un efecto de dilución por un mayor consumo de agua. Sin embargo, Beccaccia *et al.* (2015), obtuvo una reducción en la producción potencial de NH_3 a medida que el contenido en grasa del purín aumentaba en una base de datos con purines comerciales.

La adición de grasas en piensos comerciales es una estrategia recomendada en climas calurosos, ya que mejora la eficiencia de conversión de los animales y revierte los efectos negativos de la reducción del consumo cuando las temperaturas son elevadas (Quiniou *et al.*, 2000; Anguita *et al.*, 2006; Cerisuelo *et al.*, 2012). Sin embargo, hay que tener en cuenta que un nivel excesivo de grasa y algunos tipos de grasa pueden deprimir el consumo de alimento y, con ello, la productividad de los animales.

1.4 Impacto de la alimentación sobre las emisiones de CH₄ en porcino

La fuente más importante de emisión de CH₄ en porcino es la MO del purín. Las emisiones de CH₄ en una granja porcina pueden originarse en el interior de las naves y durante el almacenamiento del purín. Además, también la aplicación del purín a campo es una fuente de emisión de CH₄ (Coma y Bonet, 2004). Las emisiones de CH₄ poseen una doble vertiente, por un lado, una emisión de CH₄ incontrolada en las granjas es altamente contaminante debido a su condición de GEI y, por otro, un potencial elevado de emisión de CH₄ a partir del purín es deseado en sistemas de aprovechamiento energético mediante su digestión anaerobia. Por tanto, en el caso de emisiones incontroladas, la búsqueda de prácticas de mitigación para la industria pecuaria es necesaria (Hristov *et al.*, 2013). Sin embargo, cuando la finalidad del purín es su revalorización para la obtención de energía, se requerirá potenciar la producción de CH₄ y biogás a partir del purín.

El CH₄ es un subproducto natural de la fermentación microbiana del purín. La fermentación se produce en condiciones estrictamente anaerobias y los productos finales de la descomposición anaeróbica son CH₄, CO₂ y el material orgánico estabilizado (Figura 3). El potencial de producción de CH₄ depende de la composición específica del purín. En este sentido, las emisiones se pueden predecir a partir de las propiedades químicas del purín, es decir, de la disponibilidad de sustrato para metanógenos; que a su vez depende de la composición y la digestibilidad de la dieta. Por lo tanto, parece evidente pensar que las emisiones de CH₄ a partir del purín pueden ser controladas mediante alimentación (Petersen *et al.*, 2013). En este sentido se ha descrito que la grasa es el nutriente con un mayor potencial metanogénico seguido de la proteína y los carbohidratos (Møller *et al.*, 2004).

El proceso de degradación anaerobia que tiene lugar durante el almacenamiento del purín conlleva una serie de reacciones químicas donde interviene una gran variedad de poblaciones bacterianas. Éste proceso comprende 4 etapas (Figura 3). Brevemente:

1. **Hidrólisis:** Degradación de la MO del purín a sustratos solubles, realizada por bacterias fermentativas hidrolíticas acetogénicas. Éstas transforman las proteínas a aminoácidos, carbohidratos a monosacáridos y lípidos a ácidos grasos. Es decir, facilitan el paso de un sustrato complejo a compuestos más simples. Este proceso tiene lugar en el espacio extracelular por la acción de enzimas excretadas por las bacterias, por lo que puede resultar lento, ya que depende de factores tales como el tamaño de las partículas y de la concentración de las mismas. Cuanto más pequeño es el tamaño de partícula más fácilmente pueden actuar las enzimas. Cuanta mayor es la cantidad de MO presente, más rápidamente comienzan a aparecer metabolitos intermedios.
2. **Acidogénesis:** Los metabolitos resultantes de la hidrólisis son degradados por las mismas bacterias hidrolíticas. Estas bacterias degradan los metabolitos a AGV (propiónico, butírico y acético), alcoholes, CO_2 y H_2 . Este proceso lo sufren los monosacáridos y los aminoácidos.
3. **Acetogénesis:** Proceso de la digestión anaerobia en el que los microorganismos oxidan los ácidos orgánicos a acetato, H_2 y CO_2 . Los procesos acetogénicos son energéticamente difíciles, por lo que necesitan ser ayudados por los organismos metanogénicos u otros consumidores de hidrógeno. La termodinámica del proceso es posible sólo en un rango muy estrecho de concentración de H_2 de ahí la dependencia entre los microorganismos acetogénicos y los metanogénicos que consumen hidrógeno.
4. **Metanogénesis:** proceso que consiste en la formación de CH_4 y CO_2 principalmente a partir del acetato producido en la etapa anterior. El 70% de la producción de CH_4 tiene lugar a través de la degradación del acético (Ahring, 1995). Las bacterias metanogénicas son muy sensibles a la temperatura, existiendo tres grupos de bacterias: las termófilas (45-65 °C), las mesófilas (25-45 °C) y las psicrófilas (>25 °C) y al pH. Sus inhibidores más importantes son la presencia de oxígeno, los AGV y el ion amonio (Estrany *et al.*, 2003; Massé *et al.*, 2010; Moset *et al.*, 2011).

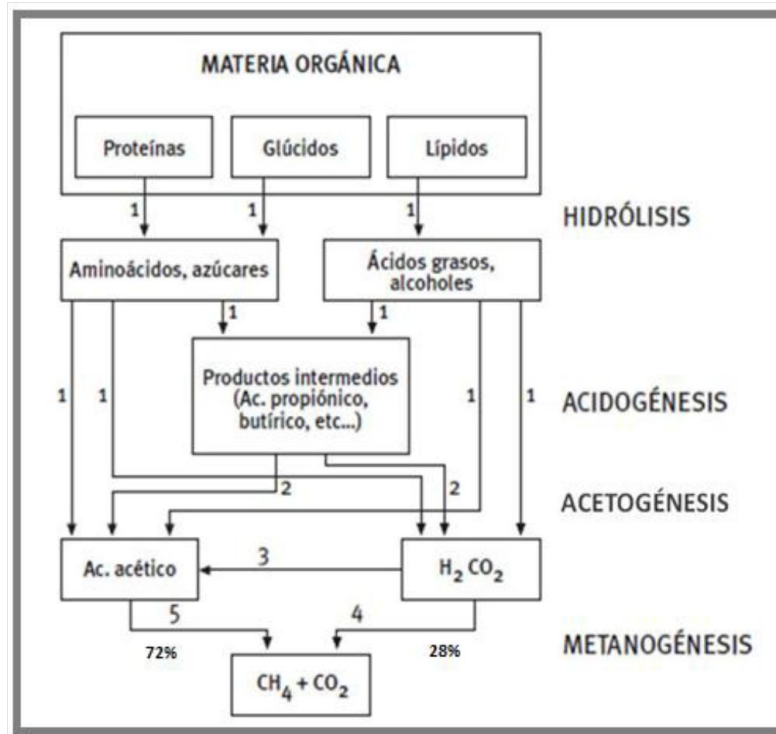


Figura 3. Fases de la degradación anaerobia. Fuente: Pavlostathis y Giraldo-Gómez (1991).

La **cantidad y el tipo de MO** que posee un purín son factores determinantes en la emisión de CH₄. En este sentido, cuanto mayor es el contenido de MO de un sustrato, mayor serán las emisiones de CH₄ generadas. Sin embargo, un exceso de MO podría inhibir la producción de CH₄ a través de la formación de compuestos inhibidores, como son los AGV y el ion amonio (Cerisuelo *et al.*, 2012).

Mejorar la digestibilidad de los alimentos podría disminuir la MO fermentable en el purín, reduciendo así el CH₄ generado (Hristov *et al.*, 2013). A continuación, al igual que con el NH₃, se destacan las evidencias científicas más importantes sobre el efecto de las principales fracciones de nutrientes (proteína, carbohidratos y grasas) sobre las emisiones de CH₄. En el caso del CH₄ no se han evidenciado estudios que indiquen una relación entre la cantidad de **proteína** del pienso y el potencial de producción de CH₄ de las heces o purín.

Debido a su acción sobre la digestibilidad de los nutrientes, la adición de **fibra** en piensos de porcino puede modificar la composición final del purín hacia un incremento de contenido en nutrientes. En la práctica, la inclusión de fuentes de fibra como los granos secos de destilería (DDGS), pulpa de remolacha y harina de colza en piensos experimentales mostraron un incremento en el contenido de carbono, MO y AGV y un aumento de la producción de CH₄ por cerdo (Jarret *et al.*, 2011a; Jarret *et al.*, 2012; Pitarch *et al.*, 2013) debido, probablemente al aumento en el contenido en MO de los purines y del mismo volumen de los purines. Sin embargo, el potencial de producción de CH₄ no siempre se ve afectado por la adición de fibra en los piensos ya que éste depende de la degradabilidad de los nutrientes incluidos en la MO del purín. En este sentido, de entre todos los componentes de la MO, la **grasa** es, con diferencia, el nutriente con mayor poder metanogénico a partir de la fermentación microbiana en comparación con la proteína o la fibra (Angelidakis y Sanders, 2004). Sin embargo, como ya se ha comentado anteriormente, la inclusión de grasa en los piensos no siempre se ve reflejada en un aumento de la grasa en heces y una variación del potencial metanogénico de los purines, esto dependerá fundamentalmente de la digestibilidad de la grasa añadida en los piensos. Al igual que ocurre con el NH₃, son escasos los estudios que relacionan la grasa en heces con las emisiones de CH₄. Según Cerisuelo *et al.* (2012), la inclusión de manteca como fuente de grasa digestible en piensos de porcino no provocó diferencias en la concentración de grasa del purín pero se observó un aumento de la emisión de CH₄ y otros gases a partir del purín debido, probablemente, a un efecto de dilución por un mayor consumo de agua. En otro estudio en el que se analizaron muestras de purines comerciales y se relacionó su composición con las emisiones de gases se observó que el contenido en grasa se encontraba positivamente relacionado con el potencial de producción de CH₄, y negativamente relacionado con el potencial de producción de NH₃, indicando una posible interacción entre la cantidad de grasa y la emisión de estos dos gases (Beccaccia *et al.*, 2015).

Sin embargo, la escasa información al respecto no permite realizar conclusiones en este sentido.

2 JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

La legislación europea ejerce una presión cada vez mayor sobre la ganadería intensiva al asociarse con efectos negativos sobre el aire y la atmósfera, la tierra y el suelo, el agua, y la biodiversidad. En la actualidad, la carne de porcino es la carne de mayor consumo a nivel mundial y es previsible que su producción aumente en las próximas décadas (Philippe y Nicks, 2015). Por ello, el impacto ambiental de su producción irá en aumento. La adopción de medidas que reduzcan el impacto ambiental en este sector y en la ganadería en general es a la vez una necesidad y una responsabilidad social. La modificación de la dieta de los animales es una de las principales estrategias utilizadas para la reducción de las emisiones de gases en ganadería. A nivel internacional, organizaciones como la Comisión Europea, el Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC) o la FAO reconocen el papel de la alimentación en el impacto ambiental de la ganadería y han propuesto estrategias para mitigar las emisiones de NH_3 y GEI a través de la alimentación basadas en la mejora de la eficiencia de utilización de los piensos y la reducción de la concentración de proteína. Sin embargo, la adopción de estas medidas necesita de investigaciones previas para conocer la relación entre los diferentes nutrientes del pienso, la composición de los purines, las emisiones y el impacto ambiental del purín.

La inclusión de subproductos fibrosos en piensos de cerdos afecta directamente a la composición de las deyecciones (Rigolot et al., 2010, Jarret et al., 2011a; Jarret et al., 2012) reduciendo las emisiones de NH_3 a medida que aumenta el contenido en fibra fermentable de la dieta (Cahn et al., 1998; Jarret et al., 2012). En términos de CH_4 , aunque éste ha sido menos estudiado, algunos estudios han demostrado una reducción del potencial de emisión de CH_4 cuando se incorporan subproductos fibrosos como los DDGS o harina de colza en los piensos (Jarret et al., 2011a; Jarret et al., 2011b) pero un aumento de las emisiones totales por animal debido a sus efectos negativos sobre la digestibilidad.

Sin embargo, la mayoría de estudios publicados en los que se investiga el efecto de la adición de fibra en los piensos sobre las emisiones de gases, la concentración de grasa en los piensos con fibra es superior a la de los piensos sin fibra para conseguir que sean isoenergéticos. Por ello, es posible que algunos de los efectos inicialmente asignados a la fibra en estos estudios se deban a otros nutrientes como la grasa. En este sentido, estudios recientes sugieren que podría haber una interacción entre el nivel de fibra y grasa en los piensos sobre las emisiones de NH_3 y CH_4 (Beccaccia *et al.*, 2015). En este contexto, los objetivos del presente estudio son valorar el efecto de la inclusión de una fuente de grasa poco digestible (jabones cálcicos de palma) a 3 niveles (0, 3,5 y 7,0%) y su interacción con una fuente de fibra fermentable (pulpa cítrica, CP) en piensos de porcino de cebo sobre las emisiones de NH_3 y CH_4 derivadas de los purines. Asimismo, se pretende cuantificar el volumen y evaluar las características químicas de las deyecciones.

Los resultados obtenidos suponen un avance en el conocimiento e interpretación de la relación entre la composición de los purines y las emisiones de gases para diseñar y adoptar estrategias de mitigación de emisiones a través de la alimentación en porcino. El presente estudio se enmarca dentro de un proyecto mayor (AGL2011-30023-C03-01) cuyos objetivos principales son identificar los componentes del purín que más influyen en los potenciales de emisión de NH_3 y CH_4 a través de diferentes estrategias de alimentación.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Ubicación del estudio e instalaciones

El ensayo se llevó a cabo en el Centro de Investigación y Tecnología Animal (CITA-IVIA) perteneciente al Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), ubicado en Segorbe (Castellón) y en los laboratorios del Departamento de Ciencia Animal de la Universidad Politécnica de Valencia (UPV) ubicado en Valencia, España.

La primera etapa de la prueba (fase de campo), realizada en la unidad de porcino del Centro de Investigación y Tecnología Animal (CITA-IVIA) consistió en la realización de un balance de digestibilidad y la recogida de muestras para la realización de un ensayo de emisiones. Para ello se utilizó una sala de cebo convencional y una sala acondicionada para la realización de ensayos de digestibilidad con 12 corrales de metabolismo.

La segunda etapa de la prueba (fase de laboratorio), se realizó en los laboratorios del Departamento de Ciencia Animal de la Universidad Politécnica de Valencia (UPV) donde se realizaron los ensayos de determinación del potencial de emisiones de NH₃ y CH₄ y las correspondientes determinaciones analíticas de la composición del purín.

3.2 Animales y diseño experimental (fase de campo)

Se emplearon un total de 30 animales machos enteros de la línea comercial Pietrain x (Landrace x Largewhite) con un peso inicial de $52,8 \pm 8,5$ kg.

La prueba se realizó en 3 tandas consecutivas conformadas por 10 animales por tanda. Cada tanda se constituyó de 2 repeticiones por tratamiento, contando con 5 tratamientos experimentales, por lo que se tuvo 6 animales por tratamiento para toda la prueba.

El periodo experimental en cada tanda se compuso de 2 etapas: una **etapa de adaptación** (al pienso experimental y los corrales de metabolismo) con una duración de 14 días (O'Connell *et al.*, 2006; Leek *et al.*, 2007; Cerisuelo *et al.*, 2010) y una **etapa de recogida de muestras** (balance de digestibilidad y ensayo de emisiones) con 7 días de duración. La duración total de este periodo experimental fue de 21 días (Figura 7).

De los 14 días del periodo de adaptación, 9 se realizaron en grupo en corrales convencionales (150 x 280 cm², 3 animales por tratamiento) localizados en una sala contigua a la sala de digestibilidad, bajo condiciones ambientales controladas (temperatura de 24 ±1 °C; Figura 4A). Durante los 5 días restantes del periodo de adaptación, los animales se alojaron en corrales de metabolismo (120 x 200 cm²; 1 animal por corral) a fin de que los animales se adaptasen a los corrales de metabolismo (Figura 4B). De los 3 animales por tratamiento adaptados en corrales convencionales, 2 fueron trasladados el día 10 de la prueba a corrales de digestibilidad. Éstos se seleccionaron en función del peso y el estado de salud.



Figura 4. Corrales convencionales (A) y corrales de metabolismo (B)

Tras el periodo de adaptación, se prosiguió con el periodo de recogida de muestras (Figura 5), el cual tuvo una duración de 7 días consecutivos. Éste a su vez se subdividió en 2 fases: 4 días para la realización del balance de digestibilidad y 3 días para la realización del ensayo de emisiones.



Figura 5. Recolección de muestras en los corrales de metabolismo

En la fase correspondiente al balance de digestibilidad, se procedió a la recolección de heces y orina por separado (práctica facilitada por los corrales de metabolismo, Figura 6), de cada animal, cada 24 horas. Las muestras diarias recolectadas de orina se acidificaron mediante la adición de 100 ml de ácido sulfúrico (H_2SO_4) al 10% /L a fin de mantener el pH de la disolución por debajo de 2 pH y evitar las pérdidas de NH_3 (Jarret *et al.*, 2012). Tanto las heces como la orina se pesaron, almacenaron en contenedores y refrigeraron a 4 °C hasta completar los 4 días de duración de la prueba.

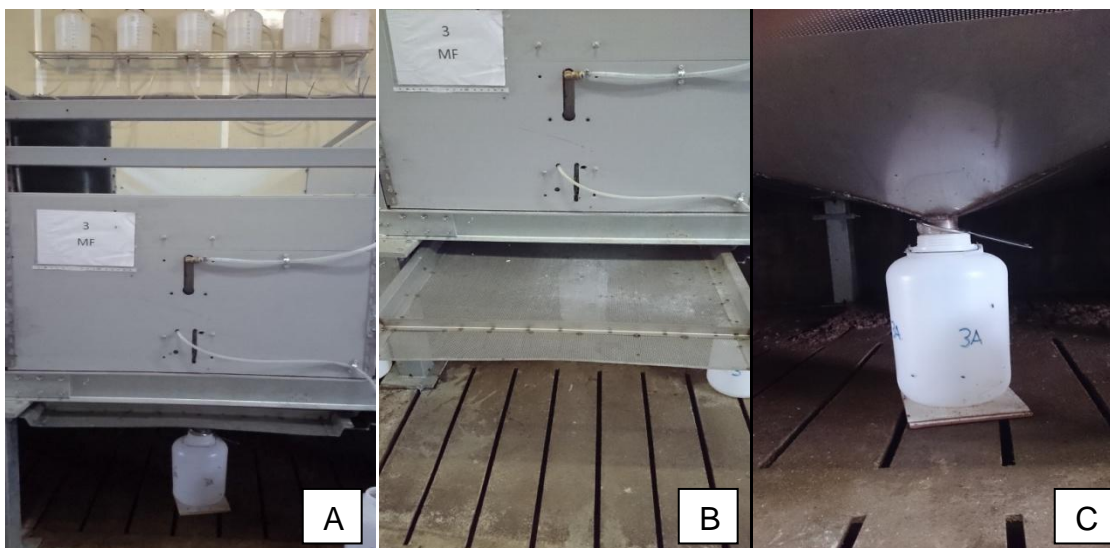


Figura 6. Sistema de recogida de heces y orina en los corrales de metabolismo (A). Filtro para la recogida de heces (B) contenedores para la recogida de orina (C).

En los 3 días siguientes, correspondiente a la recolección de muestras para el ensayo de emisiones, se efectuó similar manejo para las muestras colectadas de heces y orina con la única diferencia de que ésta vez la orina no fue acidificada con el objetivo de no interferir con el proceso de emisión de NH₃.

En este trabajo se considerará únicamente la etapa del ensayo de emisiones.

La duración total de la prueba, considerando las 3 tandas fue de 63 días.

Durante todo el periodo experimental se controló el estado sanitario de los animales atendiendo, principalmente, a la presentación de trastornos gastrointestinales o locomotores provocados por el suministro de las dietas experimentales.

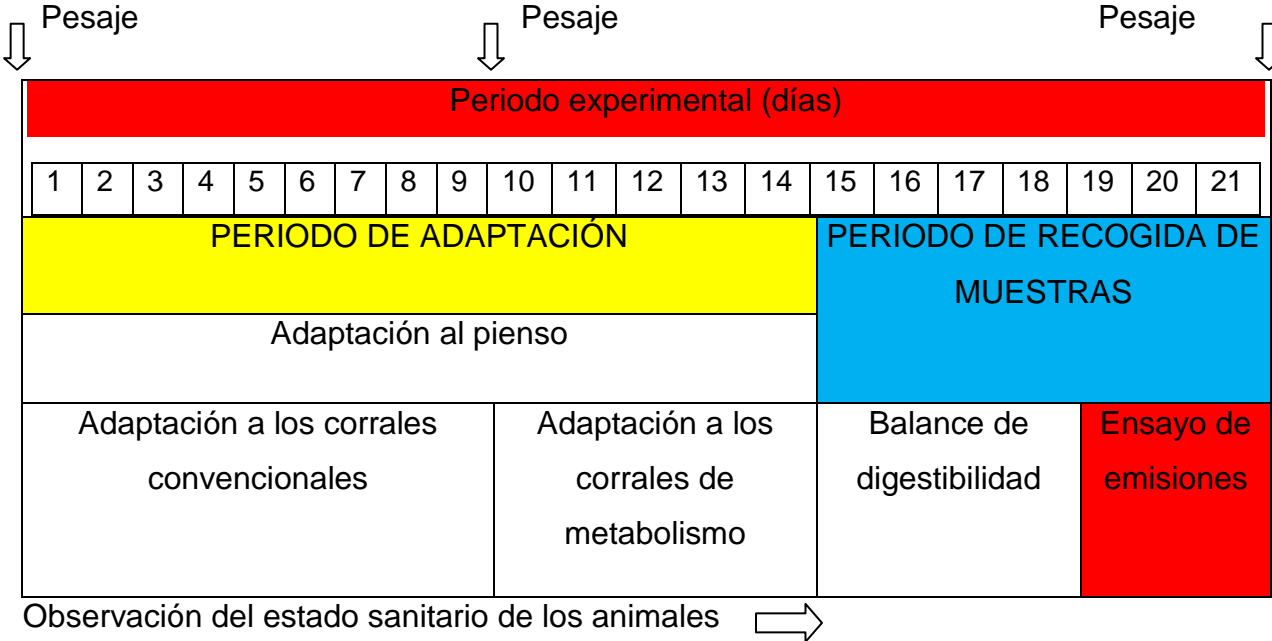


Figura 7. Esquema de tiempo, distribución y actividades relacionadas con el periodo experimental

3.3 Tratamientos

Se formularon un total de 5 piensos. Dos de éstos contenían una fuente de grasa (jabón cálcico de palma, F) incluida en el pienso a 3 niveles (0%, control; 3,5%, MF y 7%, HF) y los 2 piensos restantes incluyeron una fuente de fibra (pulpa cítrica, CP) a un mismo nivel (20%) en interacción con 2 niveles de grasa (3,5%, MF y 7%, HF). Los piensos se formularon siguiendo las Normas FEDNA (2006) para contener unos niveles mínimos de nutrientes y una ratio energía: aminoácidos relativamente constantes entre tratamientos.

El valor nutricional de los piensos y sus componentes se describen en el Anejo I.

Los piensos se formularon en el CITA y se elaboraron en la planta experimental de fabricación de piensos de la Universitat Politècnica de València (UPV). Los tratamientos evaluados se describen a continuación:

- ✓ Control (0% jabón cálcico de palma): Pienso formulado a base de cereales y soja. No incluye jabón de palma ni pulpa cítrica y su nivel de extracto etéreo (EE) es bajo.
- ✓ MF (3,5% jabón cálcico de palma): Incluye un 3.5% de jabón de palma, sin CP.
- ✓ HF (7,0% jabón cálcico de palma): Incluye un 7% de jabón de palma, sin CP.
- ✓ 20CPMF (3,5% jabón cálcico de palma): Incluye un 3.5% de jabón de palma y un 20% de CP.
- ✓ 20CPHF (7,0% jabón cálcico de palma): Incluye un 7% de jabón de palma y un 20% de CP.

3.4 Registros y toma de muestras

3.4.1 Parámetros productivos

En lo referente al pesaje de los animales, se registró el peso individual al inicio del periodo de adaptación al pienso, el día de subida a los corrales de digestibilidad y al final del periodo de recogida de muestras (Figura 8A) mediante una báscula. Tanto en la fase de adaptación como en la de recogida de muestras, el pienso y el agua se ofrecieron *ad libitum*. El consumo de pienso por corral, tanto convencional como de metabolismo, se midió mediante el control continuo de la oferta (Figura 8B) y el control del rechazo en el momento de pesaje de los animales mediante una báscula. Con estos datos se calculó la ganancia media diaria de peso (GMD¹), el consumo medio diario de pienso (CMDp²) y el consumo medio diario de agua (CMDa²).

El consumo de agua únicamente se registró en la fase de recogida de muestras mediante el control de la oferta y el rechazo diario (Figura 8C).



Figura 8. Pesaje de los animales (A), Control de suministro de pienso (B), Sistema de botellas para el control de suministro de agua (C).

3.4.2 Toma de muestra para el ensayo de emisiones y reconstitución del purín artificial

Tras el ensayo de digestibilidad, los días 5, 6 y 7 de la prueba, se procedió a la recolección de la cantidad total de heces y orina producidas en el ensayo de emisiones. Las heces y orina producidas se recogieron y pesaron cada 24 horas permaneciendo en refrigeración a 4 °C hasta el final del periodo experimental. La orina se recogió sin acidificar a fin de no interferir en el proceso de emisión de NH_3 . Diariamente, durante el ensayo de emisiones, se midió el pH de la orina y heces recogidas tal y como se indica en el apartado 3.5.1.1 referente a la determinación de pH.

Al final del periodo de recogida, se realizó un pool de heces y orina por animal y se mezcló según la ratio de excreción original de cada animal (heces: orina; Figura 9B). Así se reconstituyó un purín artificial por animal a partir del cual se realizaron las mediciones de emisiones de NH_3 y CH_4 .

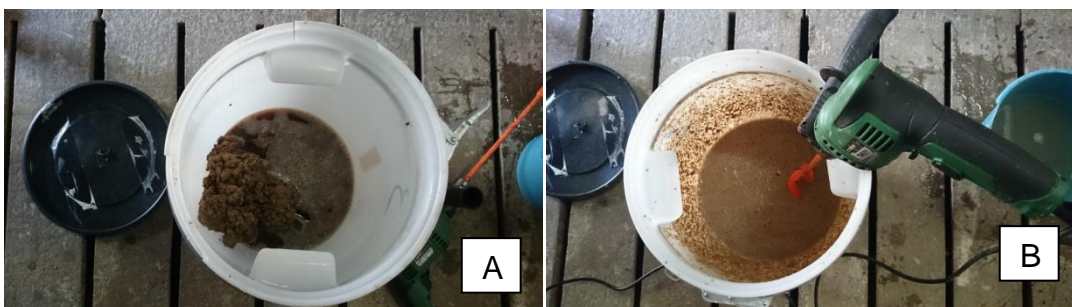


Figura 9. Reconstitución del purín (purín artificial) (A) Mezcla orina y heces
Homogenización (B)

Una vez reconstituido, el purín artificial se dividió en varias alícuotas: 2 muestras de 500 ml de purín por animal para la medición de las emisiones de NH_3 , 1 muestra de 500 ml de purín por animal para la medición de las emisiones de CH_4 , 2 tubos falcon de 50 ml para la determinación de sólidos totales (ST) y sólidos volátiles (SV), 1 tubo para la determinación de nitrógeno total Kjeldahl (NTK), 1 tubo de 10 ml para la determinación de AGV y 1 tubo falcón de 50 ml para la determinación de N-NH_3 . La muestra para la determinación de N-NH_3 se acidificó

añadiendo 1 ml de ácido clorhídrico (HCl) antes de congelar, con la finalidad de evitar pérdidas por volatilización.

Preparadas las muestras se trasladaron al departamento de Ciencia Animal de la UPV donde se mantuvieron en congelación para la realización posterior de las determinaciones analíticas, a excepción de la muestra recogida para estudiar las emisiones de NH_3 que se procesó en fresco.

3.5 Análisis de laboratorio

3.5.1 Composición química del purín

Con el objetivo de realizar una caracterización previa del purín, así como de determinar posibles relaciones entre la composición del purín y las emisiones de NH_3 y CH_4 asociadas, se procedió a la determinación de pH, SV/ST, NTK, N- NH_3 , y AGV.

3.5.1.1 Determinación de pH

La concentración del ion hidrógeno en las soluciones acuosas o medida de la acidez o la alcalinidad se midió por inmersión mediante un PH-metro modelo BASIC 20 (Crison, España). Previamente el pH-metro se calibró en 2 puntos de referencia 4 y 7 utilizando disoluciones tampón estándar.

El pH de la orina se midió directamente en el bidón de recogida, previa homogeneización.

Además, se midió el pH del purín reconstituido inmediatamente antes del inicio del ensayo de emisiones de NH_3 (Figura 10).



Figura 10. Determinación de pH del purín

3.5.1.2 Determinación de ST y SV

Los ST se determinaron por desecación a 105 °C durante 24 horas en una estufa modelo 26878 (Selecta SA, Barcelona, España; Figura 11A) según metodología AOAC (2000).

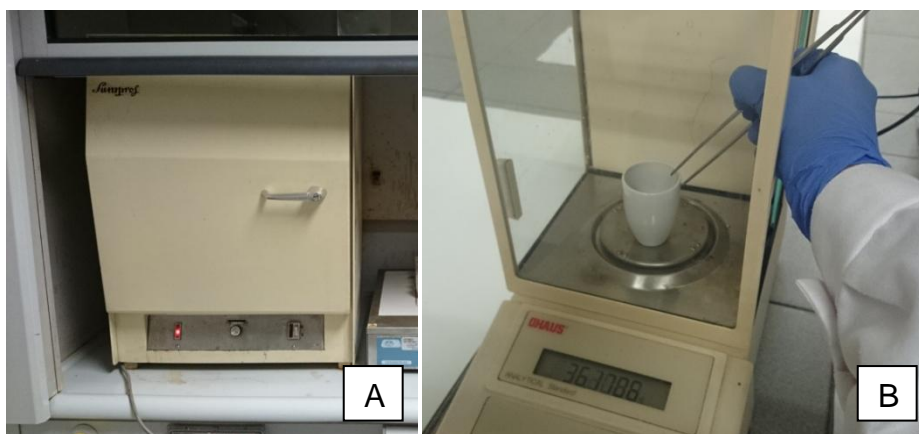


Figura 11. Estufa (A) y pesaje de crisoles (B)

Todos los pesos registrados se emplearon para efectuar los cálculos del porcentaje de ST. Empleándose la siguiente fórmula:

$$ST (\%) = \frac{\text{Peso}_{105^{\circ}\text{C}} - \text{Tara}}{\text{Peso}_{\text{muestra}}} * 100$$

Donde:

$\text{Peso}_{105^{\circ}\text{C}}$: Peso de la muestra tras 24 horas a 105°C (g)

Tara: Peso del crisol (g)

$\text{Peso}_{\text{muestra}}$: Peso de la muestra fresca (sin crisol) (g)

Posteriormente, sobre la misma muestra, se determinó el contenido en cenizas mediante calcinación de las muestras en mufla modelo 12-PR/400 (Heron, Barcelona, España; Figura 12A) a 520 °C durante 5 horas según AOAC (2000).

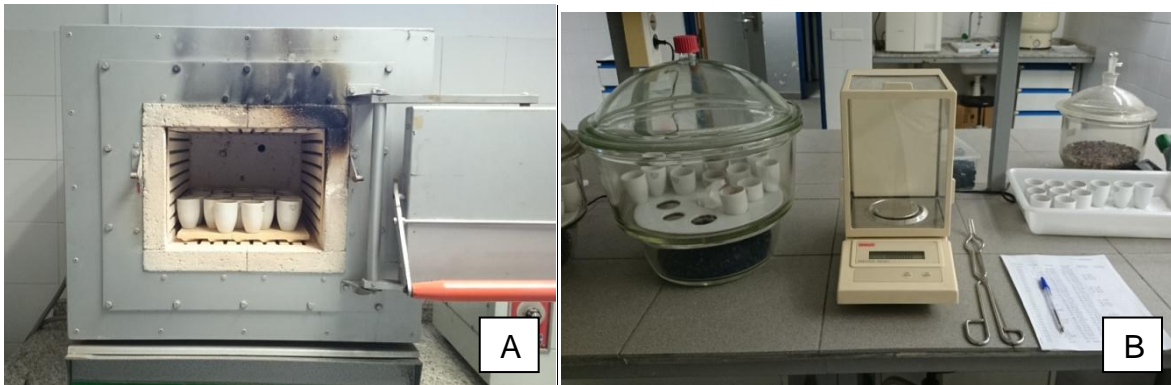


Figura 12. Mufla (A) y pesaje de crisoles (B)

El contenido en cenizas se determinó por diferencia entre el residuo seco procedente del procedimiento anterior y las cenizas. El porcentaje de SV de las muestras se calculó según la siguiente fórmula:

$$SV (\%) = \frac{Peso_{105^{\circ}C} - Peso_{520^{\circ}C}}{Peso_{muestra}} * 100$$

Donde:

$Peso_{105^{\circ}C}$: Peso de la muestra tras 24 horas a 105°C (g)

$Peso_{520^{\circ}C}$: Peso del residuo calcinado a 520°C (g)

$Peso_{muestra}$: Peso de la muestra fresca (sin crisol) (g)

3.5.1.3 Determinación de AGV

Para la determinación de AGV se empleó el método descrito por Jouany (1982) mediante la adición de un patrón interno (4-metilvalérico) y posterior análisis mediante cromatografía de gases (Fisons 8000 Series, Fisons, Milan, Italy; Figura 9). El cromatógrafo estaba dotado de un detector FID y un inyector en modo splits para cuantificar las cantidades de AGV presentes en la muestra.



Figura 13. Cromatógrafo de gases Fisons 8000 Series (Fisons, Milan, Italy)

Al utilizar un patrón interno (4-metil-valérico), los cálculos se basaron en el factor de respuesta (Fr).

$$Fr = \frac{C_{agv} * A_{pi}}{C_{pi} * A_{agv}}$$

Fr= Factor de respuesta

C_{agv}= Concentración del ácido graso volátil

C_{pi}= Concentración del patrón interno

A_{agv}=Área del ácido graso volátil

A_{pi}=Área del patrón interno

A partir de ésta fórmula, se calculan los factores de respuesta para cada AGV, valores que posteriormente en el cálculo de concentración de los AGV en la muestra.

3.5.1.4 Determinación de NTK

La determinación del contenido de NTK se realizó por destilación y valoración de la muestra, mediante un equipo Kjeltex 2300 (FOSS, Suecia) según Método Kjeldahl 4500-NH₃ C de la AOAC (2000).

El análisis se realiza en 2 fases; una fase previa de digestión, seguida de una fase de destilación. Para la fase de digestión, se pesaron 3 g de purín en una balanza de precisión modelo Ohaus Analytical Standard AS120 (Florham Park,N.J.,USA), la muestra se depositó en un tubo de digestión Kjeldahl, se añadieron 15 ml de H₂SO₄ concentrado, 1 tableta de catalizador y 2 gotas de antiespumante. El análisis de las muestras se realizó por duplicado más 2 blancos (tubos de digestión Kjeldahl sin muestra que sufrieron el mismo tratamiento que las muestras). Una vez preparadas las muestras, se llevaron a una batería de digestión con extractor de vapores Digester 2020 (FOSS, Suecia) a 420 °C durante 1 hora, hasta que el color de las muestras contenidas en el tubo de digestión alcancen un color verde claro. A través de éste proceso se consigue que

los compuestos orgánicos nitrogenados tomen formas amoniacales (sales amoniacales).

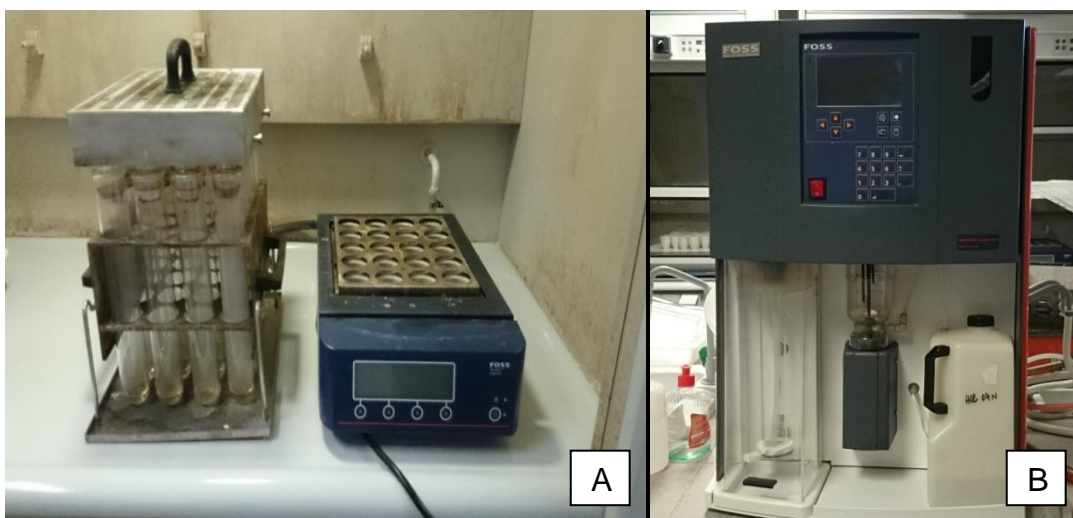


Figura 14. Kjeltec 2300 (FOSS, Suecia). Fases de digestión (A) y destilación (B).

Para la segunda fase, correspondiente a la destilación de la muestra digerida, se emplea un destilador de arrastre de vapor Kjeltec 2300 (FOSS, Suecia). La fase de destilación consiste en la adición de una base fuerte, Hidróxido de Sodio (NaOH) al 40%, que consigue elevar el pH de la disolución y desplazar el equilibrio hacia la formación de NH_3 libre. Éste destilado se recoge en un reactivo de recepción constituido por ácido bórico (H_3BO_3), una solución de verde de bromocresol al 0,1 % y una solución de rojo de metilo al 0,1 %. El NH_3 se retiene en éste medio para luego realizarse la valoración mediante titulación con ácido clorhídrico (HCl) 0,1 N factor 1, dando directamente el resultado en ml de ácido empleado en la valoración del NH_3 contenido en la muestra. El N total se calcula utilizando la siguiente fórmula:

$$N_k(\text{mg/kg}) = \frac{14000 * (V_m - V_{bl}) * N_{HCl}}{M_{muestra}}$$

Dónde:

$M_{muestra}$: Cantidad de muestra (g),

V_m : Volumen de HCl consumido en la valoración de la muestra (mL),

V_{bl} : Volumen de HCl consumido en la valoración del blanco

N_{HCl} : Normalidad del HCl.

3.5.1.5 Determinación de N-NH₃

El contenido en N- NH₃ se determinó por destilación directa del NH₃ mediante un equipo Kjeltec 2300 (FOSS, Suecia) según AOAC (2000). Para ello se procedió de forma similar a la determinación del NTK. La diferencia con la determinación de NTK radica en la sustitución de la base de NaOH por una base débil como el Tetraborato de Sodio al 2,5% y el Ácido clorhídrico (HCl) a 0,01 N.

3.6 Ensayo de potencial de emisiones de NH₃

Para la determinación del potencial de emisión de NH₃, referido a mg//L/día de purín se empleó el método de cámara dinámica o trampas húmedo-acidas (Pereira, 2012); éste método consiste en hacer circular un flujo de aire conocido a través de una trampa ácida, de manera que el gas queda atrapado en dicho sustrato (Estellés, 2007; Figura 15).

La emisión se estimó considerando las concentraciones de entrada y de salida de flujo de aire intercambiado y la concentración de NH₃ en el ácido para calcular la emisión de NH₃ en mg/L de purín.

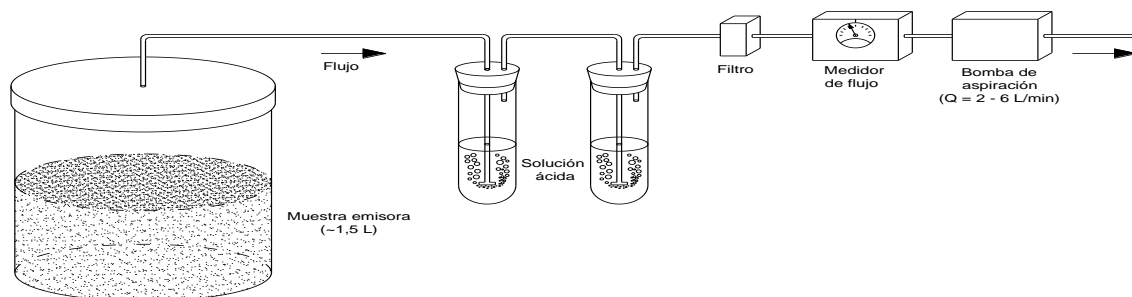


Figura 15. Esquematización de una cámara dinámica

A su llegada al laboratorio, las dos alícuotas de 0,5 L de purín por animal se homogeneizaron y fueron colocadas en un recipiente cilíndrico cerrado de 1 L de capacidad. Al recipiente se agregó 50 ml de agua destilada a fin de evitar formación de costras sobre la superficie de la muestra ya que éstas podrían interferir con el proceso de emisión de NH_3 . El recipiente cilíndrico disponía de 2 orificios, 1 orificio de entrada de aire del exterior y 1 orificio de salida conectado a dos borboteadores en serie a través de un tubo polietileno. Los contenedores con las muestras permanecieron sumergidos durante toda la prueba en un baño modelo Precistern (J.Selecta p, España) a condiciones de temperatura constante de 24 ± 1 °C. Los borboteadores (trampas húmedo-ácidas) contenían una solución de 100 ml de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 0.1 N. Al final de la línea de salida se situó una bomba de aspiración modelo ZA.32 9210003 (DVP, Taiwan) con una capacidad de aspiración de 32 L/min de flujo de aire. A través de éste sistema, se extrajo aire de manera continuada de cada uno de los recipientes que contenían el purín a testar con un caudal constante de 1.2 L/min. El NH_3 emitido quedaba retenido en los dos borboteadores. Posteriormente, se pesó la cantidad de ácido de cada borboteador mediante una báscula modelo Pioneer's RS232 (OHAUS, China) y se analizó el contenido en NH_3 retenido en la solución ácida.

Como complemento de la cámara, se trabajó con un filtro de aire modelo 7037001 (DVP, Italia) y un tercer borboteador en línea y en frío con el objetivo de proteger la bomba de aspiración (Figura 16).



Figura 16. Cámara dinámica

Previamente a la puesta en marcha del sistema de trampas ácidas se verificó y registró el caudal mediante un medidor de caudal modelo Rota (Yokogawa, Alemania). En total se trabajó con 16 líneas en simultáneo.

La prueba duró 11 días por cada tanda de muestras analizadas. Las trampas húmedo-ácidas o solución captadora de NH_3 se reemplazaron cada 24 horas los primeros 5 días del ensayo, mientras que los 6 días restantes se cambiaron cada 48 horas. Estas muestras se almacenaron en contenedores de plástico de una capacidad de 250 ml de volumen los cuales estaban previamente rotulados considerando tanto el tratamiento como la procedencia del impinger (primer o segundo impinger).

La determinación de la concentración de NH_3 en las soluciones ácidas de los borboteadores se determinó en los laboratorios del Instituto de Ciencia y Tecnología Animal (ICTA). Estas determinaciones se realizaron mediante una sonda de medición del NH_3 (Orion High Performance Ammonia Electrode) modelo 9512HPBNWP (Thermo Scientific, USA; Figura 17A) y el procesador de información (Orion Dual Star Meter) modelo 2115000 (Thermo Scientific, USA; Figura 17B). El funcionamiento del electrodo de medición se basa en la utilización de una membrana hidrofóbica permeable al gas que separa la solución interna de la muestra a determinar. Para la medición es necesario conseguir que todo el N-NH_3 pase a NH_3 disuelto que se pueda difundir a través de la membrana hasta que la presión parcial del NH_3 sea proporcional a su concentración. Para ello, es necesario aumentar el pH de la disolución hasta valores de entre 11 y 13 añadiendo hidróxido de Sodio (NaOH).

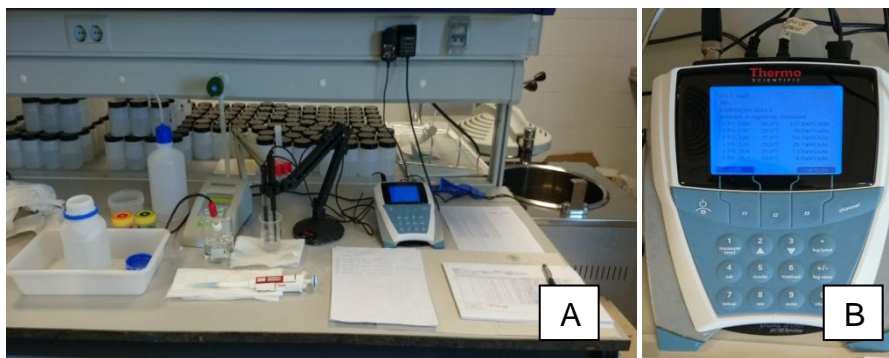


Figura 17. Sonda de medición del NH_3 (Orion High Performance Ammonia Electrode) modelo 9512HPBNWP (Thermo Scientific, USA) (A) y procesador de información (Orion Dual Star Meter) modelo 2115000 (Thermo Scientific, USA) (B).

Previamente a las mediciones de NH_3 fue necesario calibrar la sonda de medición (Figura 18). Para ello, se realizó una recta de calibración mediante la preparación de 6 disoluciones a concentración creciente de sulfato de amonio $(NH_4)_2SO_4$. Ésta calibración se adaptó al tipo de muestra a analizar. Aquellas que procedían de los primeros borboteadores, es decir, aquellos que capturaban la mayor parte de NH_3 se analizaron con una calibración de rango alto (100-1090 $mgNH_4/L$). Mientras que aquellos que procedían de los segundos borboteadores y contenían una menor cantidad de NH_3 retenido se midieron con una calibración de rango bajo (0-16 $mgNH_4/L$).



Figura 18. Calibración de la sonda de medición de NH_3

Para cada determinación se utilizaron un total de 25 ml de solución ácida. Las mediciones se realizaron utilizando un agitador (Stirrer Probe) modelo 096019 (Thermo Scientific, USA) para asegurar que la muestra fuera homogénea.

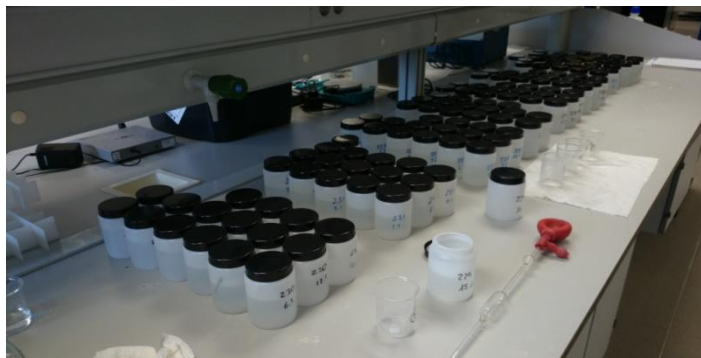


Figura 19. Muestras para análisis de NH_3

Durante ésta determinación analítica se midió en paralelo la evolución del pH a fin de comprobar que el valor requerido se encuentre entre 11 y 13 pH. Para ello se empleó de un pH-metro modelo BASIC 20 (Crison, España).

La información obtenida se registró para su posterior análisis.

3.7 Ensayo de potencial de emisiones de CH_4

La medición del potencial de emisión de CH_4 se realizó mediante incubación *in vitro* en condiciones de anaerobiosis de una mezcla de purín y un inóculo (ratio constante entre animales) a una temperatura constante de 35°C durante 30 días. Para ello, se emplearon viales de vidrio de 120 mL de capacidad, herméticamente cerrados, siguiendo el protocolo desarrollado por Zhang *et al.* (2007) y Angelidaki *et al.* (2009).

Para cada muestra se preparó un volumen de purín más inóculo de 250 ml. donde cada vial contuvo un volumen total de 60 ml (inóculo anaerobio más purín) donde la ratio SV inóculo/ SV purín era igual a 1. Ello ocupó el 50% del volumen del vial; el 50% restante permitió acumular la producción de biogás. Previamente al análisis se tomaron 10 ml de cada muestra para la determinación de SV y cálculo del volumen de muestra a introducir en los viales. El inóculo empleado en ésta

prueba se obtuvo de los digestores anaerobios del Instituto de Ciencia y Tecnología Animal (ICTA). Dichos digestores, se mantuvieron en régimen mesófilo (35°C) con un tiempo de retención hidráulico de 15 días, con una velocidad de carga orgánica de 1 gr SV/L día; con el fin de agotar la MO residual biodegradable (desgasificación).

Una vez preparada la mezcla a introducir en los viales, se verificó el pH mediante un pH-metro modelo BASIC 20 (Crison, España) de una precisión $\pm 0,01$ calibrado en 2 puntos de referencia 4 y 7 utilizando disoluciones tampón estándar; para comprobar que la mezcla de purín e inóculo se encontraba en torno a la neutralidad. No se efectuaron ajustes.

A continuación, se rellenaron 3 viales (3 repeticiones) por purín a testar. También se rellenaron 3 viales únicamente con inóculo pero sin purín (blancos) con objetivo de determinar la producción endógena de biogás del inóculo, que posteriormente se sustrajo de la producción acumulada del purín.

Antes de cerrar los viales, se aplicó N_2 (gaseó) sobre cada vial durante 1 minuto con la finalidad de desplazar el oxígeno presente y asegurar la anaerobiosis. Seguidamente se cerraron los viales mediante séptum de butilo y se sellaron con una cápsula de aluminio mediante un encapsulador.

Una vez realizado el montaje, se midió la presión inicial de cada vial mediante un manómetro modelo HD 9220 (Delta Ohm, España) (Figura 20B). y los viales se introdujeron en una estufa modelo 2001247 (Aqualytic, Alemania) a una temperatura constante de incubación de 35 °C (Figura 20A).

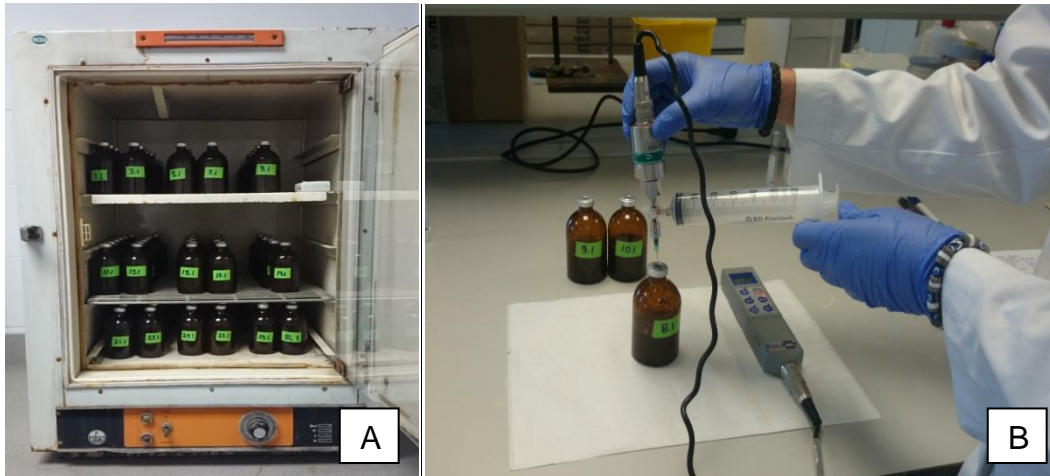


Figura 20. Estufa de incubación a 35°C (A) y medición de presión y volumen de biogás (B).

La presión en el interior de los viales se midió diariamente durante los 5 primeros días de incubación y posteriormente se extrajo mediante una jeringa de 60 ml de capacidad, el volumen de biogás necesario para llevar la presión en el interior de los viales a valores entre 1.02 y 1.00 atm.

El incremento de la presión se considera un indicador para monitorizar la producción de biogás. Los parámetros de concentración, presión y volumen se registraron en una hoja de campo en cada medición.

La frecuencia de medición de presión y volumen de biogás se fue reduciendo con el tiempo de incubación hasta un mínimo de 3 determinaciones a la semana. El día 1 de incubación y una vez por semana se recuperó muestra de biogás para la determinación de la concentración de CH₄.

La concentración en CH₄ en el interior de los viales se midió a través de cromatografía de gases mediante un equipo cromatógrafo (Fisons 8000 Series, Fisons, Milan, Italy) dotado de un detector FID y un inyector en modo Split, columna empacada GS-Q de 0,320 mm de diámetro y 30 m de longitud, temperatura del detector y del inyector de 200°C y temperatura del horno constante (70°C).

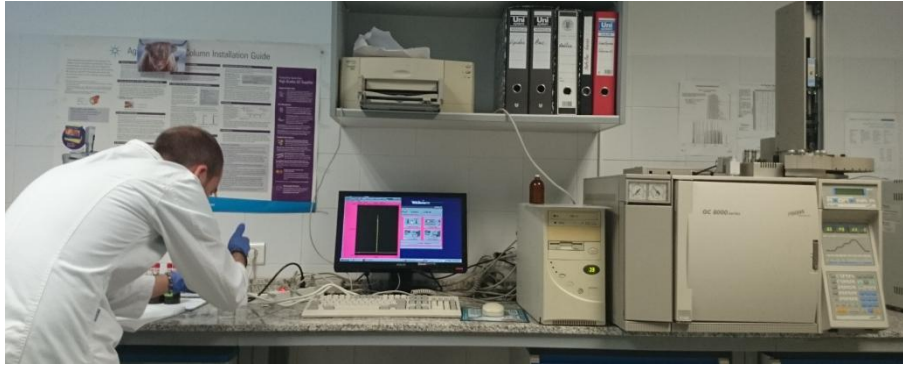


Figura 21. Determinación de la concentración de CH₄

Para determinar la concentración de CH₄, fue necesario realizar una recta de calibración utilizando un patrón de mezcla conocido de CO₂ y CH₄.

Para ello se procedió a inyectar 6 cantidades creciente de la mezcla dentro de los rangos de 0,05 a 1 ml; para obtener los diferentes puntos de la recta.

Para efectuar los cálculos de producción de biogás fue necesario monitorizar la presión y el volumen a lo largo del tiempo producido de cada vial. A partir de ello, se calculó el volumen que ocuparía en condiciones normales dicho gas de acuerdo con la ley de Boyle-Mariotte:

$$\frac{P1 * V1}{T1} = \frac{P2 * V2}{T2}$$

Donde:

P1: Presión inicial (atm)

V1: Volumen inicial (litros)

T1: Temperatura inicial (*Kelvin)

P2: Presión tras muestreo (atm)

V2: Volumen tras muestreo (litros)

T2: Temperatura tras muestreo (*Kelvin)

Tras inyectarse la muestra en el cromatógrafo se calculó el volumen de CH_4 producido a partir de los moles de CH_4 obtenido por ml de muestra inyectada mediante la ecuación de gases ideales.

$$V_{CH_4} = \frac{n * R * T}{P}$$

Donde:

V_{CH_4} : Volumen (litros)

P: Presión (atm)

N: Moles de gas

R: Constante universal de los gases ideales (0.082 atm l/mol *K)

T: Temperatura (*Kelvin)

Por tanto, a partir del volumen de CH_4 producido por botella podemos calcular el potencial de producción de CH_4 (P_{CH_4}) expresado como volumen de CH_4 producido por gramo de MO añadida (medida como SV). Este índice se calcula como el volumen de CH_4 producido por vial a lo largo del ciclo, dividido por la cantidad total de SV añadidos.

$$P_{CH_4} = \frac{V_{CH_4ac}}{g SV}$$

Donde:

P_{CH_4} : Producción acumulada de CH_4 (ml. CH_4 /g SV)

V_{CH_4ac} : Volumen de CH_4 acumulado por botella (ml)

G SV: Gramos de SV introducidos

3.8 Análisis Estadístico

Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el paquete estadístico SAS© System Software (SAS, 2001).

Para todas las variables los efectos del tipo de pienso fueron analizados mediante un análisis factorial con 2 niveles de grasa (MF y HF) y la inclusión o no de CP en ambos niveles de grasa. Para ello se utilizó el procedimiento PROC GLM de SAS que incluyó la tanda, el tipo de pienso y su interacción como efectos principales. También se realizaron contrastes entre el pienso control y los demás tratamientos mediante el test Dunnett de SAS. Para todas las variables estudiadas se consideró el animal como unidad experimental.

Además, para estudiar la evolución de las emisiones de CH₄ en el tiempo se utilizó el procedimiento PROC MIXED de SAS.

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El efecto tanda no fue significativo para ninguna de las variables estudiadas. Por esta razón este efecto fue eliminado del análisis estadístico.

4.1 Datos productivos de los animales

El peso medio de los animales al inicio de la etapa de adaptación, los pesos a la subida y bajada de los corrales de metabolismo, el consumo medio diario de pienso, la ganancia media diaria de peso y los consumos de agua se muestran en la Tabla 1.

El peso de los animales al inicio de la etapa adaptación fue similar entre tratamientos y se situó en torno a los $52,8 \pm 8,5$ kg de media. Tampoco se observaron diferencias significativas entre tratamientos en relación a los pesos de los animales a la subida y la bajada de los corrales de metabolismo.

Tabla 1. Peso medio de los animales, consumo medio diario de pienso (CMDp), ganancia media diaria de peso (GMD) y consumo medio diario agua (CMDa) durante el periodo de recogida de muestras

| Tratamiento ¹ | Control | MF | HF | 20CPMF | 20CPHF | SEM | P-Valor ² | | |
|--|---------|------|------|--------|--------|-------|----------------------|--------|-------|
| | | | | | | | F | CP | F*CP |
| N | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | | | | |
| Peso inicio adaptación (kg) | 52,6 | 50,9 | 53,5 | 53,1 | 53,9 | 0,582 | 0,652 | 0,727 | 0,795 |
| Peso subida corrales de metabolismo (kg) | 57,0 | 57,0 | 60,1 | 57,7 | 58,3 | 0,733 | 0,601 | 0,881 | 0,731 |
| Peso bajada corrales de metabolismo (kg) | 68,0 | 66,0 | 70,0 | 65,0 | 67,2 | 0,700 | 0,386 | 0,604 | 0,795 |
| CMDp ³ (g/d) | 1828 | 1667 | 1897 | 1670 | 1757 | 80,3 | 0,025 | 0,309 | 0,286 |
| GMD ⁵ (g/d) | 737 | 720 | 787 | 567 | 637 | 27,8 | 0,029 | <0,001 | 0,946 |
| CMDa ³ (g/d) | 3516 | 3402 | 3924 | 3483 | 3983 | 298 | 0,100 | 0,813 | 0,969 |

¹ Control (0% jabón cálcico de palma): Pienso formulado a base de cereales y soja, no incluye jabón de palma ni pulpa cítrica y su nivel de extracto etéreo (EE) es bajo; MF (3,5% jabón cálcico de palma): Incluye un 3,5% de jabón de palma, sin pulpa cítrica; HF (7,0% jabón cálcico de palma): Incluye un 7% de jabón cálcico de palma, sin pulpa cítrica; 20CPMF (3,5% jabón cálcico de palma): Incluye un 3,5% de jabón cálcico de palma y un 20% de pulpa cítrica; 20CPHF (7,0% jabón cálcico de palma): Incluye un 7% de jabón cálcico de palma y un 20% de pulpa cítrica.

² F: Nivel de grasa; CP: Inclusión de pulpa cítrica; F*CP: Interacción entre el nivel de grasa y la inclusión de pulpa cítrica.

³ Considera todo el periodo de recogida de muestras

⁴ Considera el periodo entre la subida y la bajada de los animales de las jaulas

⁵ Contraste Control vs 20CPMF P<0,05

Respecto al CMD de pienso se observó un efecto significativo del nivel de jabón cálcico añadido, independientemente de la inclusión de PC. En este sentido, los animales que ingirieron piensos con un 7% de grasa añadida mostraron un mayor (P = 0,025) consumo que los animales que ingirieron los piensos con un 3,5% de

grasa añadida. Esto representa un incremento del CMD alrededor de un 9,5%. Sin embargo, los animales del tratamiento control que consumieron un pienso con un nivel bajo de grasa mostraron consumos similares a los piensos HF. Al contrario que lo observado en este estudio, los piensos ricos en grasa suelen tener un efecto supresor sobre consumo de alimento en monogástricos (Nyachoti *et al.*, 2009; Cerisuelo *et al.*, 2012). Esto es debido a que los animales alimentados *ad libitum* tienden a regular el consumo de pienso según sus necesidades energéticas. Los resultados del presente estudio podrían estar ligados a la fuente de grasa utilizada. Los jabones cálcicos de palma, en términos de aporte energético, son poco digestibles frente a otros tipos de grasa (De Blas, 2010) y es posible que por ello, causen el efecto contrario al esperado. En otras investigaciones en las que se emplearon fuentes de grasa más digestibles como la manteca de cerdo (Cerisuelo *et al.*, 2012; Beccaccia *et al.*, 2015) se observó el efecto esperado.

En cuanto a la ausencia de efecto de la inclusión de CP sobre la ingestión, una gran cantidad de estudios en la literatura señalan que los ingredientes con un elevado contenido en fibra fermentable (como la CP o la de remolacha) tienen una elevada capacidad de retención de agua y pueden aumentar la viscosidad en la parte superior del tracto intestinal, reduciendo con ello la velocidad de vaciado estomacal y aumentando la sensación de saciedad (Gerrits y Verstegen, 2004; Beccaccia *et al.*, 2015). Sin embargo, estudios recientes con CP deshidratada en porcino (Pitarch *et al.*, 2013) no muestran variaciones en el consumo de pienso, al igual que en este estudio. Es posible que por la elevada degradabilidad de su fibra, este ingrediente ejerza un menor poder saciante que los demás.

En relación a la GMD de peso, el aumento de la proporción de grasa añadida en los piensos dio lugar a mayores ganancias de peso ($P = 0,029$). Esto puede estar relacionado con el mayor consumo de pienso en comparación con los piensos MF y su mayor, aunque ligero, contenido en energía neta (EN). Por otro lado, la inclusión de CP redujo la ganancia de peso ($P < 0,001$) respecto a aquellos tratamientos que no incluyeron esta fuente de fibra en su composición. En este

caso, ya que el consumo no se ve afectado por este factor, parece que el menor contenido en EN de los piensos con CP podría ser el responsable. Está bien descrito en la literatura que los ingredientes fibrosos muestran, generalmente, un menor contenido en EN debido a su difícil digestión.

Para el CMD de agua, no se observaron diferencias significativas entre tratamientos y este se situó en torno a los 3660 ± 680 kg de media.

A pesar de las diferencias observadas en esta prueba, hay que tener en cuenta que con el tamaño muestral de este estudio (30 animales en total y 6 animales por tratamiento) los resultados de rendimientos productivos deberían ser interpretados con cautela. Sin embargo, las conclusiones que se extraen son referenciales para este ensayo, pues permite observar que los parámetros productivos se encuentran dentro de la normalidad y no tendrán influencia alguna sobre el ensayo.

4.2 Volumen y características químicas iniciales del purín

En la tabla 2 se observa los volúmenes de producción de heces, orina y purín colectado, así como las características químicas iniciales del purín reconstituido.

Tabla 2. Volumen de excreción de heces, orina y purín y características químicas iniciales del purín

| Tratamiento ¹ | Control | MF | HF | CPMF | CPHF | SEM | P-Valor ² | | |
|--|---------|------|------|------|------|-------|----------------------|-------|-------|
| | | | | | | | F | CP | F*CP |
| N | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | | | | |
| Volúmenes de heces, orina y purín | | | | | | | | | |
| Heces (g/día) | 737 | 672 | 880 | 637 | 782 | 48,2 | 0,002 | 0,195 | 0,537 |
| Orina (g/día) | 1153 | 1110 | 1313 | 1467 | 1254 | 160 | 0,975 | 0,352 | 0,200 |
| Purín (g/d) | 1890 | 1782 | 2192 | 2104 | 2036 | 153 | 0,286 | 0,602 | 0,141 |
| Características iniciales del purín | | | | | | | | | |
| Sólidos totales (g/kg) | 167 | 146 | 166 | 135 | 144 | 13,1 | 0,279 | 0,203 | 0,686 |
| Sólidos volátiles (g/kg) | 134 | 119 | 138 | 108 | 114 | 11,0 | 0,261 | 0,130 | 0,568 |
| pH purín | 8,52 | 8,08 | 7,65 | 8,13 | 8,18 | 0,183 | 0,354 | 0,157 | 0,239 |
| Ácidos grasos volátiles total (mmol/L) | 86,0 | 69,7 | 90,6 | 75,9 | 96,2 | 7,82 | 0,020 | 0,481 | 0,971 |
| Ácido acético (mmol/L) | 55,5 | 44,4 | 57,4 | 49,7 | 62,8 | 4,79 | 0,018 | 0,306 | 0,989 |
| Ácido propiónico (mmol/L) | 14,4 | 12,4 | 15,6 | 12,0 | 14,8 | 1,63 | 0,088 | 0,718 | 0,895 |
| Ácido butírico (mmol/L) | 7,86 | 6,63 | 9,75 | 7,25 | 9,72 | 1,67 | 0,119 | 0,865 | 0,852 |

¹ Control (0% jabón cálcico de palma): Pienso formulado a base de cereales y soja, no incluye jabón de palma ni pulpa cítrica y su nivel de extracto etéreo (EE) es bajo; MF (3,5% jabón cálcico de palma): Incluye un 3,5% de jabón de palma, sin pulpa cítrica; HF (7,0% jabón cálcico de palma): Incluye un 7% de jabón cálcico de palma, sin pulpa cítrica; 20CPMF (3,5% jabón cálcico de palma): Incluye un 3,5% de jabón cálcico de palma y un 20% de pulpa cítrica; 20CPHF (7,0% jabón cálcico de palma): Incluye un 7% de jabón cálcico de palma y un 20% de pulpa cítrica.

² F: Nivel de grasa; CP: Inclusión de pulpa cítrica; F*CP: Interacción entre el nivel de grasa y la inclusión de pulpa cítrica.

³ Contraste Control vs HF (P<0,05)

⁴ Contraste Control vs 20CPHF (P<0,05)

Respecto a los volúmenes de heces generados, el incremento de la proporción de jabón cálcico de palma en los piensos dio lugar a un aumento ($P = 0,002$) del volumen de heces excretado al día. Sin embargo, la inclusión de CP no dio lugar a diferencias en la producción de heces entre tratamientos. Según estos resultados, la inclusión de altos niveles de jabón cálcico de palma no parece mejorar la digestibilidad de la MS de los piensos, tal y como indican algunos autores para fuentes de grasa más digestibles (Beccaccia *et al.*, 2015), sino todo lo contrario. Esto unido a la mayor ingestión en estos grupos de animales da lugar a una mayor producción de heces. Por otro lado, en contraste con los resultados encontrados en este estudio, diversos autores reportan que la inclusión de fibra fermentable en los piensos puede estar relacionada con una disminución de la digestibilidad de la MO y, por tanto, en un incremento del volumen de heces producidas (Souffrant, 2001; Wenk *et al.*, 2001; Hansen *et al.*, 2006; Bindelle *et al.*, 2008; Jarret *et al.*, 2012). Sin embargo, el efecto anteriormente mencionado no fue evidente en este estudio, lo que sugiere de nuevo que la degradabilidad de la CP utilizada en este estudio fue elevada.

La cantidad de orina excretada por los animales y los volúmenes de purín reconstituido no fueron significativamente diferentes entre tratamientos. Esto indica que las diferencias en producción de heces pudieran mitigarse cuando se considera el volumen de purín.

En lo que corresponde a la composición del purín, no se observaron diferencias en la concentración de ST, SV y pH inicial del purín entre tratamientos. Por el contrario, otros estudios (Galassi *et al.*, 2010) observan un aumento en el contenido de ST y SV en dietas con un contenido de fibra. De nuevo, la elevada degradabilidad de la CP utilizada en este estudio puede ser la responsable de la falta de efectos sobre el purín.

En relación al pH del purín, no se observaron diferencias entre niveles de grasa e inclusión o no de CP.

Tal y como se ha comentado anteriormente, la adición de CP no tuvo un efecto sobre la concentración de AGV en el purín. Sin embargo, sí se observó un aumento en la concentración de AGV totales en el purín al incrementar la proporción de grasa añadida en los piensos. En este sentido, un incremento del nivel de grasa añadida de 3,5% a 7,0% dio lugar a mayores ($P = 0,020$) concentraciones de AGV, en especial de ácido acético ($P = 0,018$) en los purines. Este efecto indica que la adición de grasa podría activar la actividad microbiana en el intestino grueso de los animales, al contrario de lo que describen algunos trabajos en porcino y al contrario de lo que ocurre en rumiantes. Así mismo, esta fermentación podría considerarse beneficiosa a nivel intestinal debido a su efecto positivo sobre el ácido propiónico ($P = 0.088$).

4.3 Emisiones de NH_3 y CH_4 generados por el purín

En la Tabla 3 se muestran los resultados relativos al ensayo de volatilización de NH_3 y se describe la composición en componentes nitrogenados y pH del purín al inicio y final del ensayo.

Tabla 3. Emisiones de amoniaco y balance de N durante el ensayo de volatilización.

| Tratamiento ¹ | Control | MF | HF | 20CPMF | 20CPHF | SEM | P-Valor ² | | |
|---|---------|------|------|--------|--------|-------|----------------------|-------|-------|
| | | | | | | | F | CP | F*CP |
| N | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | | | | |
| N-NH ₃ inicial (g/L) | 3,61 | 3,43 | 2,81 | 3,04 | 3,06 | 0,568 | 0,605 | 0,905 | 0,589 |
| N-NH ₃ final (g/L) | 5,27 | 4,38 | 4,14 | 4,09 | 4,23 | 0,445 | 0,905 | 0,789 | 0,633 |
| NTK inicial (g/L) | 10,2 | 8,99 | 8,31 | 8,79 | 8,84 | 0,674 | 0,622 | 0,791 | 0,566 |
| NTK final (g/L) | 9,01 | 7,58 | 7,30 | 7,55 | 7,75 | 0,616 | 0,945 | 0,706 | 0,660 |
| Emisiones de NH₃ | | | | | | | | | |
| g NH ₃ /L purín ^{3,4,5} | 2,41 | 2,32 | 1,59 | 1,80 | 1,77 | 0,188 | 0,036 | 0,332 | 0,053 |
| g N-NH ₃ /kg NTK inicial | 193 | 218 | 162 | 182 | 166 | 21,3 | 0,144 | 0,504 | 0,399 |
| g NH ₃ /animal y día | 4,40 | 4,15 | 3,48 | 3,89 | 3,55 | 0,452 | 0,323 | 0,845 | 0,742 |

¹ Control (0% jabón cálcico de palma): Pienso formulado a base de cereales y soja, no incluye jabón de palma ni pulpa cítrica y su nivel de extracto etéreo (EE) es bajo; MF (3,5% jabón cálcico de palma): Incluye un 3,5% de jabón de palma, sin pulpa cítrica; HF (7,0% jabón cálcico de palma): Incluye un 7% de jabón cálcico de palma, sin pulpa cítrica; 20CPMF (3,5% jabón cálcico de palma): Incluye un 3,5% de jabón cálcico de palma y un 20% de pulpa cítrica; 20CPHF (7,0% jabón cálcico de palma): Incluye un 7% de jabón cálcico de palma y un 20% de pulpa cítrica

² F: Nivel de grasa; CP: Inclusión de pulpa cítrica; F*CP: Interacción entre el nivel de grasa y la inclusión de pulpa cítrica.

³ Contraste Control vs 20CPMF P<0,05

⁴ Contraste Control vs 20CPHF P<0,05

⁵ Contraste Control vs HF P<0,05

Duración del ensayo: 11 días

Como es de esperar, la cantidad de N- NH₃ al finalizar el ensayo de volatilización fue superior que la cantidad inicial debido a la propia volatilización de NH₃. Sin embargo, la cantidad de NTK se redujo alrededor de un 13,17% y el pH 9,87% puntos de media desde el inicio hasta el final del ensayo de volatilización de NH₃. Entre tratamientos, no se observaron diferencias significativas en términos de N- NH₃ inicial, N- NH₃ final, NTK inicial, NTK final ni tampoco en pH inicial y pH final.

En el presente estudio se encontró un efecto significativo del nivel de grasa añadida sobre las emisiones de NH_3 por litro de purín. En este sentido, los purines derivados de animales alimentados con un mayor nivel de grasa añadida (7,0%) mostraron menores ($P = 0,036$) emisiones de NH_3 durante 11 días. Por otro lado, contrariamente a lo que se describe en la literatura, la inclusión de CP como fuente de fibra fermentable no modificó las emisiones de NH_3 en comparación con la no inclusión de pulpa. Sin embargo, vale la pena destacar que existe una interacción ($P = 0,053$) entre el nivel de grasa añadida y la adición de CP que sugiere que, en los tratamientos con un nivel medio de grasa añadida (MF), al adicionar CP las emisiones de NH_3 se reducen. En cambio, en los tratamientos con unos niveles altos de grasa añadida (HF), la inclusión de CP apenas modifica las emisiones, o incluso las incrementa ligeramente. Estos resultados podrían indicar que la reducción de las emisiones de NH_3 del purín que se observa al incluir fuentes de fibra fermentable en los piensos pudiera depender del nivel de grasa añadida en los piensos. Un nivel alto de grasa sería inhibitorio por si mismo mientras que con un nivel medio de grasa, la inclusión de CP tendrá un efecto aditivo, sobre la reducción de estas emisiones.

La justificación del efecto inhibitorio de la grasa sobre las emisiones de NH_3 no está clara. De hecho, aunque existe alguna otra evidencia al respecto (Beccaccia *et al.*, 2015), las referencias a este efecto en la literatura son más bien escasas.

Sin embargo, en la mayoría de estos estudios, los piensos con un mayor nivel de fibra implican un mayor contenido en grasa con tal de conseguir la condición de isoenergéticos. Según los resultados obtenidos en el presente estudio en el que los efectos de la grasa añadida se separan de los efectos de la fibra, los efectos inicialmente asignados a la fibra en otros estudios podrían en realidad ser debidos a la grasa o a una combinación de ambos nutrientes. La explicación al efecto inhibitorio de la grasa sobre las emisiones de NH_3 no está clara. De hecho las evidencias al respecto en la literatura son más bien escasas. Una posible explicación podría ser el efecto de la grasa sobre la formación de AGV. Sin embargo, en este estudio, este incremento de los AGV totales no implicó

diferencias en pH. Otra posible explicación podría ser un efecto inhibitorio de la grasa sobre la ureasa o los microorganismos responsables de su producción. Sin embargo esta evidencia no ha sido descrita con anterioridad.

Por otro lado, la disminución de las emisiones de NH_3 cuando se añaden fuentes de fibra fermentable en la dieta está ampliamente documentada. Las razones que se describen para explicar este efecto son, en primer lugar, una modificación de la partición del N de las dietas entre las fracciones de orina y heces debido a la fermentación microbiana de la fibra en el intestino grueso (Mroz *et al.*, 2000 y Zervas y Zijlstra, 2002). Como resultado de esta fermentación, una mayor proporción de N se incorpora a las heces en forma de N microbiano (N orgánico) mientras que habrá una menor proporción de N que se eliminará en forma de urea (N inorgánico). El N excretado en la orina en forma de urea (N inorgánico), es más susceptible a la descomposición y volatilización que el N excretado en las heces (N orgánico) (Mroz *et al.*, 1993). En consecuencia, este cambio en la partición del N hace que el N de los purines de animales alimentados con fibra fermentable sean menos susceptible a la descomposición (Hansen *et al.*, 2006). Por otro lado, esta fermentación influye de manera positiva en la excreción de AGV y negativa en el pH del purín (Bach Knudsen *et al.*, 1991 y Jensen y Jorgensen, 1994; Canh *et al.*, 1998a, Canh *et al.*, 1998b y Mroz *et al.*, 2000; O'Connell *et al.*, 2006; Galassi *et al.*, 2010; Bindelle *et al.*, 2008). Ya que la emisión de NH_3 a partir de suspensión está directamente relacionada con el valor del pH en la suspensión, esta reducción en el pH debería reducir las emisiones de NH_3 orina principalmente en forma de urea (N orgánico), que es más susceptible a la descomposición bacteriana de nitrógeno excretado en las heces (N inorgánico) (Mroz *et al.*, 1993). En consecuencia, la repartición del nitrógeno en la suspensión es menos susceptible a la descomposición (Hansen *et al.*, 2006).

En la tabla 4 se muestra el potencial de producción de CH_4 y la producción de CH_4 a 30 días.

Tabla 4. Emisiones potenciales de metano

| Tratamiento ¹ | Control | MF | HF | 20CPM | 20CPHF | SEM | P-Valor ² | | |
|--|---------|------|------|-------|--------|------|----------------------|-------|-------|
| | | | | | | | F | CP | F*CP |
| Potencial de producción CH ₄ (mL/g SV añadido) ^{1,2} | 239 | 253 | 307 | 289 | 355 | 14,3 | <0,001 | 0,014 | 0,708 |
| Producción CH ₄ (L purín /animal/día) ^{1,2} | 61,0 | 55,5 | 94,5 | 59,3 | 84,9 | 5,37 | <0,01 | 0,627 | 0,268 |

¹ Control (0% jabón cálcico de palma): Pienso formulado a base de cereales y soja, no incluye jabón de palma ni pulpa cítrica y su nivel de extracto etéreo (EE) es bajo; MF (3,5% jabón cálcico de palma): Incluye un 3,5% de jabón de palma, sin pulpa cítrica; HF (7,0% jabón cálcico de palma): Incluye un 7% de jabón cálcico de palma, sin pulpa cítrica; 20CPMF (3,5% jabón cálcico de palma): Incluye un 3,5% de jabón cálcico de palma y un 20% de pulpa cítrica; 20CPHF (7,0% jabón cálcico de palma): Incluye un 7% de jabón cálcico de palma y un 20% de pulpa cítrica.

² F: Nivel de grasa; CP: Inclusión de pulpa cítrica; F*CP: Interacción entre el nivel de grasa y la inclusión de pulpa cítrica.

³ Contraste Control vs 20CPHF P<0,05

⁴ Contraste Control vs HF P<0,05

⁵ Duración del ensayo: 30 días

En el presente estudio se encontró un efecto significativo de la grasa sobre el potencial de producción CH₄. En este sentido, un incremento del porcentaje de grasa añadida de 3,5% a 7,0% incrementó el potencial de producción de CH₄ en 21, 34 mL/g SV añadido de media. También, la adición de CP incrementó el potencial de producción de CH₄ a 30 días.

En concordancia con los resultados encontrados en este estudio, Li *et al.* (2002) sugiere que la cantidad y el origen de la grasa pueden estar involucradas en las emisiones y en el potencial de producción de CH₄ a partir de purines, debido a sus efectos en el proceso de la fermentación microbiana. En el presente estudio, la adición de una fuente de grasa poco digestible se realizó con la intención de asegurar una cierta cantidad de grasa en heces y observar los principales efectos. Es conocido que la grasa es el nutriente con mayor potencial metanogénico por g en comparación con la proteína y los carbohidratos (Möller *et al.*, 2004). En este

sentido se ha demostrado que la adición de diferentes fuentes de grasas a las deyecciones de ganado vacuno y porcino, incrementan la producción de CH₄ durante la digestión anaerobia (Li *et al.*, 2002; Möller *et al.*, 2004) y eso mismo ha ocurrido en el presente estudio.

Con respecto a la fibra, ésta uno de los principales sustratos energéticos disponibles para la generación de CH₄ en el purín por su carácter indigestible. No obstante, la proporción de fibra que llega al purín depende de la fibra que finalmente es fermentada por el animal y ésta depende de su composición. De este modo, las fuentes de fibra soluble (como β-glucanos, oligosacáridos o pectinas) son fácilmente digeridas por las enzimas microbianas mientras que los componentes altamente lignificados permanecen sin fermentar incluso tras un largo periodo de tiempo (Jarret *et al.*, 2011a). En el presente estudio, el purín de los animales alimentados con CP parece contener compuestos más biodegradables que el purín de animales alimentados con piensos sin CP y, por ello, el potencial de producción de CH₄ es mayor en estos grupos de animales.

Cuando la producción de CH₄ se calcula por animal y día (para la que se tiene en cuenta la cantidad de SV producidos), la emisión aumenta con la adición de niveles crecientes de grasa (igual que la cantidad de heces excretadas). En comparación con el tratamiento control, las emisiones totales por animal y día fueron superiores (P<0,05) en los tratamientos con niveles altos de grasa añadida (HF y 20CPHF), resultado que sigue la línea discutida para los anteriores resultados.

Con respecto a la adición de fibra en los piensos, no se encontró un efecto significativo de la fibra sobre el potencial de producción CH₄. Y aunque este efecto no fue evidenciado en esta investigación, la adición de productos ricos en fibra en dietas de cerdos puede modificar la composición final del purín, resultando en un incremento en el contenido de carbono, MO y AGV y, por tanto, aumento en la producción de CH₄ (Jarret *et al.*, 2011a; Jarret *et al.*, 2012). Sin embargo, la CP no tiene efecto en éste estudio, ya que tampoco afecta a la cantidad de heces excretadas.

En definitiva, la grasa tiene un efecto positivo muy importante sobre el potencial de producción de CH₄ a partir del purín. También la inclusión de fibra fácilmente fermentable parece incrementar la biodegradabilidad de las heces.

En la figura 22 se muestra la evolución del potencial de producción de CH₄ acumulado durante los 30 días de incubación.

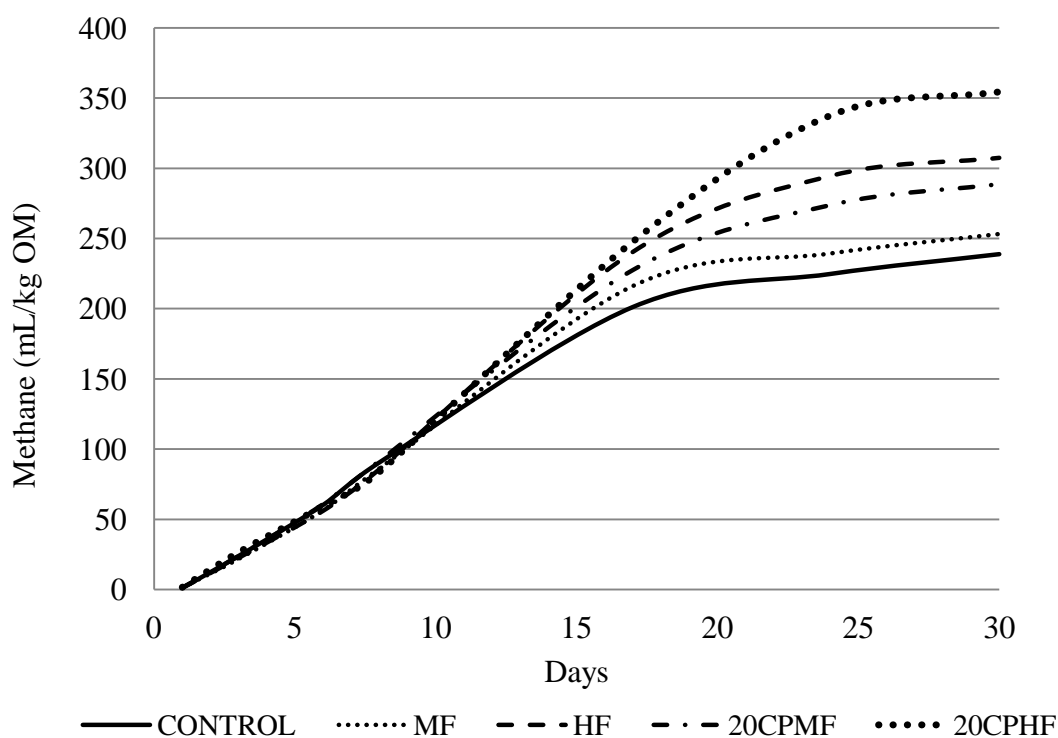


Figura 22. Evolución de la producción acumulada de CH₄ hasta el día 30 de incubación.

Además es importante destacar que las variables dietéticas no siempre son independientes y el aumento o disminución de las concentraciones de un componente de la dieta pueden derivar en un aumento o disminución de las concentraciones de las emisiones. Es por ello, que las opciones de mitigación destinadas a reducir las emisiones de NH₃ pueden dar lugar a elevadas concentraciones de CH₄, tal y como ocurre en el presente estudio y en otros

trabajos en la literatura (Dijkstra, 2011). Por tanto, los efectos sobre las emisiones de gases de efecto invernadero como consecuencia de los cambios en los nutrientes tienen que ser interpretados en el contexto de los efectos potenciales resultantes en otros componentes de la dieta (Hristov et al., 2013).

5 CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente estudio permiten extraer las siguientes conclusiones:

1. La inclusión de un elevado (7%) porcentaje de jabones cálcicos en los piensos incrementó el volumen de heces producidas con respecto a la inclusión de niveles moderados (3,5%) de este ingrediente. Un incremento del consumo diario de pienso puede ser el responsable de estas diferencias. Sin embargo, la inclusión de un 20% de CP no modificó el volumen de heces producido, independientemente del nivel de grasa añadida. Considerando la orina, el volumen total de purín producido no fue diferente entre tratamientos.
2. Un incremento del nivel de jabones cálcicos en los piensos y la adición o no de CP no modificó la composición inicial del purín en términos de sólidos totales, sólidos volátiles y pH. Sin embargo, el incremento de la proporción de jabones cálcicos en los piensos de un 3,5 a un 7% incrementó la concentración de ácidos grasos volátiles, en especial de ácido acético ($P = 0,018$) y propiónico ($P = 0,088$), lo que indica una cierta actividad fermentativa de esta grasa a nivel intestinal.
3. Las emisiones de NH_3 / L de purín disminuyeron ($P = 0.036$) con el nivel de jabón cálcico añadido. Sin embargo, la adición de CP no parece tener un efecto por sí sola sobre las emisiones de NH_3 . Nuestros resultados indican que el efecto mitigador de las emisiones de NH_3 provocado por la fibra fermentable puede depender del nivel de grasa de los piensos. En este sentido, en los tratamientos con un nivel medio de grasa añadida (MF), al adicionar CP las emisiones de NH_3 se reducen. En cambio, en los tratamientos con unos niveles altos de grasa añadida (HF), la inclusión de CP apenas modifica las emisiones, o incluso las incrementa ligeramente.

4. Tanto el nivel de jabón cálcico añadido y la adición de CP incrementaron, por separado, el potencial de emisión de CH₄ a 30 días. Esto indica un aumento de la biodegradabilidad de los purines resultantes de estas estrategias de alimentación. Sin embargo, únicamente el nivel de jabón cálcico añadido dio lugar a un incremento de la producción total de CH₄ por animal, probablemente debido al mayor volumen de heces producido en estos tratamientos.

6 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aarnink, AJA & Verstegen MWA (2007). Nutrition, key factor to reduce environmental load from pig production. *Livestock. Science* 109 (1): 194-203.

Andrés, P. (2008). El abonado de suelos con purines: buscando la reducción de riesgos. Consultado el 11 de 02 de 2015, de 3tres3: https://www.3tres3.com/medioambiente/el-abonado-de-suelos-con-purines-buscando-la-reduccion-de-riesgos_2353/

Angelidaki, I. & Sanders, W., (2004). Assessment of the anaerobic biodegradability of macropollutants. *Reviews in Environment. Science and Biotechnology*. 3, 117–129.

Anguita M., Canibe N., Pérez JF., Jensen BB., (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. *Journal of Animal Science* 84: 2766-2778.

AOAC (Association of Official Analytical Chemists) (2000). Official Methods of Analysis, 17th ed. Gaithersberg, Virginia, USA

Beccaccia, AF., Ferrer, P., Ibáñez, MA. Estellés, F., Rodríguez, C., Moset, V., De Blas, C. Calvet, S. & García-Rebollar, P. (2015). Relationships among slurry characteristics and gaseous emissions at different types of commercial Spanish pig farms. *Spanish Journal Agricultural Research* doi: 10.5424/sjar/2015131-6575.

Bindelle, J., Buldgen, A., Delacollette, M., Wavreille J., & Agneessens R. (2008). Influence of source and concentrations of dietary fiber on in vivo nitrogen excretion pathways in pigs as reflected by in vitro fermentation and nitrogen incorporation by fecal bacteria. *Journal of Animal Science* 87 (2): 583-593.

Calvet (2005). Estimación de emisiones de gases efecto invernadero y amoníaco generados por diversas actividades agrarias. Trabajo de suficiencia investigadora, Universitat Politècnica de Valencia.

Canh, TT., Sutton, AL., Aarnink, AJA., Verstegen, MWA., Schrama JW & Bakker GCM. (1998a). Dietary carbohydrates alter the fecal composition and pH and the ammonia emission from slurry of growing pigs. *Journal of Animal Science*: 1887–1895.

Canh, TT., Aarnink, AJA., Verstegen., MWA. & Schrama, JW. (1998b). Influence of dietary factors on the pH and ammonia emission of slurry from growing–finishing pigs. *Journal of Animal Science* 76:1123–1130.

Cera, KR., Mahan DC. & Cross, RF. (1988). Effect of age, weaning and postweaning diet on small intestinal growth and jejuna morphology in young swine. *J. Anim. Sci.* 66:574–584.

Cederberg, C., Hedenus, F., Wirsenius, S. & Sonesson, U. (2012). Trends in greenhouse gas emissions from consumption and production of animal food products implications for long term climate targets. *Cambridge Journals*: 330-340.

Cerisuelo, A., Torres, A., Lainez, M. & Moset V. (2012). Increasing energy and lysine in diets for growing-finishing pigs in hot environmental conditions: Consequences on performance, digestibility, slurry composition, and gas emission. *Journal of Animal Science* 90:1489-1498.

Coma & Bonet. (2004). Producción ganadera y contaminación ambiental. *XX Curso de especialización FEDNA* 237-272. Barcelona: Sitio Argentino de Producción Animal.

De Blas C, Mateos GG, Rebollar PG, (2010). Tablas FEDNA de composición y valor nutritivo de alimentos para la fabricación de piensos compuestos. Madrid: Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal

Dinuccio, E., Berg, W. & BALSARI, P. (2008). Gaseous emissions from the storage of untreated slurries and the fractions obtained after mechanical separation. *Atmosph. Environ.* 42: 2448-2459.

Dolz, S. (1996). Utilización de grasas y subproductos lipídicos. XII Curso de Especialización FEDNA. MADRID, 7 y 8 de Noviembre de 1996: FEDNA.

Estellés, F. (2007). Diseño y puesta en funcionamiento de una cámara dinámica para el registro de emisiones de gases procedentes de estiércoles y pequeños animales. Tesina Final de Máster. ETSI Agrónomos. Universidad Politécnica de Valencia.

Estrany, F., Delgado I., & Oliver R. (2003) El aprovechamiento energético de la biomasa. *Técnica Industrial* 249: 42-47

Friel, S., Dangour, AD., Garnett, T., Lock, K., Chalabi, Z., Roberts, I., Butler, A., Butler, CD., Waage, J., McMichael, AJ. & Haines, A. (2009). Public health benefits of strategies to reduce greenhouse gas emissions: food and agriculture. *Lancet* 374, 2016–2025.

Galassi, G., Colombini, S., Malagutti, L., Crovetto GM. & Rapetti, L. (2010). Effects of high fibre and low protein diets on performance, digestibility, nitrogen excretion and ammonia emission in the heavy pig. *Animal Feed Science and Technology* 161: 140-148.

Gerber, P., MacLeod, M., Opio, C., Vellinga, T., Falcucci, A., Weiler, V., Tempio, G., Gianni, G. & Dietze, K. 2012. Greenhouse gas emissions from livestock food chains: a global assessment. Bratislava, EAAP

Gerrits, WJJ & Verstegen, MWA (2006). El papel de la fibra dietética en la alimentación porcina. *XXII Curso de Especialización FEDNA* 19-35. Barcelona

Gill, M., Smith, P. & Wilkinson, JM. (2010). Mitigation climate change: the role of domestic livestock. *Animal Feed Science and Technology* 4(3):323-333

Guía de mejores técnicas disponibles del sector porcino (MTD's) (2010). Comisión Europea. Consultado el 20 de 02 de 2015, de http://www.magrama.gob.es/es/ganaderia/publicaciones/guiamtdssectorporcino_tcm7-5872.pdf

Halas, D., Hansen, C.F., Hampson, D.J., Kim, J.C., Mullan, B.P., Wilson, R.H. & Pluske, JR., (2010). Effects of benzoic acid and inulin on ammonia-nitrogen excretion, plasma urea levels, and the pH in faeces and urine of weaner pigs. *Livestock Science*. 134: 243-245.

Hansen, MJ., Chwalibog, A. & Tauson, AH (2006). Influence of different fibre sources in diets for growing pigs on chemical composition of faeces and slurry and ammonia emission from slurry. *Animal* 134 (3): 326–336.

Hayes, ET., Curran, TP. & Dodda, VA. (2006). Odour and ammonia emissions from intensive pig units in Ireland. *Elsevier*, *Bioresource Technology*, 97 (7): 940-948

Hristov, A., Oh, J., Lee, C., Meinen, R., Montes, F., Ott, T., Firkins, J., Rotz, A., Dell, C., Adesogan, A., Yang, W., Tricarico, J., Kebreab, K., Waghorn, G., Dijkstra J. Oosting, S. (2013). Mitigación de las emisiones de gases de efecto invernadero en la producción ganadera. FAO, *Producción y Sanidad Animal* 177.

Integrated Pollution Prevention and Control (IPPC). (2003). Reference document on best available techniques for intensive rearing of poultry and pigs.

IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change). 2007. *Climate Change 2007: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* (Core Writing Team: R.K. Pachauri & A. Reisinger, eds.), p. 104. Geneva, Switzerland, IPCC. http://www.ipcc.ch/publications_and_data/publications_ipcc_fourth_assessment_report_synthesis_report.htm.

Jarret, G., Cozannet, P., Martinez, J., Dourmad, JY., 2011a. Effect of different quality wheat dried distiller's grain solubles (DDGS) in pig diets on composition of

excreta and methane production from faeces and slurry. *Livestock Production Science* 140, 275-282.

Jarret, G., Martinez, J., Dourmad, J.Y., 2011b. Effect of biofuel co-products in pig diets on the excretory patterns of N and C and on the subsequent ammonia and methane emissions from pig effluent. *Animal* 5, 622–631.

Jarret, G., Cerisuelo, A., Peu, P., Martinez, J., Dourmad, J.Y., 2012. Impact of pig diets with different fibre contents on the composition of excreta and their gaseous emissions and anaerobic digestion. *Agriculture, Ecosystems & Environment*. 160: 51–58.

Jongbloed, AW. & Lenis, NP. (1998). Environmental concerns about animal manure. *Journal of Animal Science* 76 (10): 2641–2648.

Jouany, JP. (1982). Volatile fatty acid and alcohol determination in digestive contents, silage juices, bacterial cultures and anaerobic fermentor contents. *Sciences Alimera*. 2, 131–144.

Leek, ABG., Callan, JJ., Reilly, P., Beattie, VE. & O’Doherty, JV. (2007). Apparent component digestibility and manure ammonia emission in finishing pigs fed diets based on barley, maize or wheat prepared without or with exogenous non-starch polysaccharide enzymes. *Animal Feed Science Technology* 135: 86–99.

Leip, A., Weiss, F., Wassenaar, T., Perez, I., Fellmann, T., Loudjani, P., Tubiello, F., Grandgirard, D., Monni, S. & Biala, K. (2010): Evaluation of the livestock sector's contribution to the EU greenhouse gas emissions (GGELS) – final report. European Commission, Joint Research Centre.

Lenis, NP. & Jongbloed, AW. (1999). New technologies in low pollution swine diets: diet manipulation and use of synthetic amino acids, phytase and phase feeding for reduction of nitrogen and phosphorus excretion and ammonia emission. *Journal of Animal Science* 12: 305-327

Li, S., Sauer, WC. & Hardin, RT. (1994) Effect of fibre on amino acid digestibility in young pigs. *Journal Animal Science* 74:327–333.

Lorimor, J., Powers, W. & Sutton, A. (2000). *Manure Characteristics. Manure Management System Series. Section 1, MWPS (Midwest Plan Service)-18.* Iowa State University Publ., Ames, USA.

Massé, DI., Massé, L., Xia, Y.& Gilbert, Y. (2010). Potential of low-temperature anaerobic digestion to address current environmental concerns on swine production. *Journal of Animal Science* (88): 112-120.

Michelangeli, CL. (2007). Effects of different fats on nutrient and fatty acid digestibilities in growing pigs. *Sitio Argentino de Producción Animal* , 86-88.

Møller, H.B., Sommer, S.G., Ahring, B.K., (2004). Methane productivity of manure, straw and solid fractions of manure. *Biomass and Bioenergy* 36: 485-495.

Moset, V., Torres, L., Torres, A. G. and Cerisuelo, A., (2010). Increasing energy and lysine in diets for growing-finishing pigs in hot environments: a preliminary study on its consequences on productive performance, slurry composition and gas emissions. *International Symposium on Air Quality and Manure Management for Agriculture (ASABE).* Dallas (Texas), 12-15 Septiembre 2010.

Moset, V. (2011). Estudio de la caracterización y estabilización anaerobia de purin con y sin separación previa de sólida. *Riunet* .

Muck, RE. (1982). Nitrogen losses from manure storages. *Agricultural Wastes* 4 (1) 41–54.

Nyachoti, CM., Zijlstra, RT., De Lange, CFM. & Patience, JF. (2004). Voluntary feed intake in growing-finishing pigs: A review of the main determining factors and potential approaches for accurate predictions. *Canadian Journal of Animal Science* 84(4): 549-566.

O'Connell, JM., Callan, JJ. & O'Doherty JV. (2006). The effect of dietary crude protein level, cereal type and exogenous enzyme supplementation on nutrient

digestibility, nitrogen excretion, faecal volatile fatty acid concentration and ammonia emissions from pigs. *Animal Feed Science and Technology* 127:73–88.

O'Shea, CJ, Sweeney, T., Lynch, MB., Gahan, DA., Callan, JJ & O'Doherty, JV. (2010). Effect of β -glucans contained in barley-and oat-based diets and exogenous enzyme supplementation on gastrointestinal fermentation of finisher pigs and subsequent manure odor and ammonia emissions. *Journal of Animal Science* 88 (4): 1411-1420.

Patridge, GC., & BP. Gill. 2001. New approaches with weaner pig diets. Page 205 in Recent developments in pig nutrition 3. P. C. Garnsworthy and J. Wiseman, ed. Nottingham Univ. Press, Nottingham, UK.

Petersen SO., Blanchard M., Chadwick D., Del Prado A., Edouard N., Mosquera J., Sommer SG. (2013). Manure management for greenhouse gas mitigation *Animal* 7 (2): 266-282.

Philippe, FX. & Nicks, B. (2015) Review on greenhouse gas emissions from pig houses: Production of carbon dioxide, methane and nitrous oxide by animals and manure. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 199: 10-25

Piñeiro, C. & Montalvo, J. (2005). XXI Curso de Especialización FEDNA: *Avances en nutrición y alimentación animal*. Fira de Madrid, España. 189-212.

Pitarch, A., Moset, V., Ferrer, P., Hernández, P., Bonet, J. & Coma, C. & Cerisuelo, A. (2013) Efectos de la incorporación de altos niveles de harina de colza en piensos de cerdos de engorde. *Anaporc: revista de la Asociación de Porcinocultura Científica* 97 (10): 20-26

Portejoie, S., Dourmad, JY., Martinez, J. & Lebreton, Y. (2004). Effect of lowering crude protein on nitrogen excretion, manure composition and ammonia emission from fattening pigs. *Livestock Production Science* 91:45–55.

Quiniou, N., Noblet J. & Dubois., S. (2000). Voluntary feed intake & feeding behaviour of group-housed growing pigs are affected by ambient temperature and body weight. *Livestock Production Science* 63:245–253.

Rigolot, C., Espagnol, S., Pomar, C. & Dourmad, JY. (2010). Modelling of manure production by pigs and NH₃, N₂O and CH₄ emissions. Part I: animal excretion and enteric CH₄, effect of feeding and performance. *Animal*, 4:8: 1401-1412.

Rotz, CA. (2004). Management to reduce nitrogen losses in animal production. *Journal of Animal Science* 82: 119-137.

Sanes, D. (2014). Análisis de las emisiones de amoníaco a la atmósfera procedente de las explotaciones de porcino de la Comunidad Valenciana utilizando metodologías SIG. *Riunet* , 1-53.

Seinfeld JH. & Pandis, SN. (1998). Atmospheric Chemistry and Physics of Air Pollution.2, John Wiley. *New York*, 1326.

Sommer, SG. & Moller, HB. (2002). Reduction in methane and nitrous oxide emission from animal slurry through anaerobic digestion. Non- CO₂ Greenhouse Gases, Van Ham, Baede, Guicherit and Williams- Jacobse 475-479.

Souffrant, WB. (2001). Effect of dietary fibre on ileal digestibility and endogenous nitrogen losses in the pig. *Animal Feed Science and Technology* 90 (1-2):93-102.

Vilarrasa E. & Barroeta AC. (2014) .Factores que afectan a los procesos de digestión y absorción de las grasas. *NutriNews* Oct-Nov, 85-92.

Westhoek, H., Rood, T., Van der Berg, M., Janse, J., Nijdam, D., Reudrik, M., & Stehfest, E. (2011). The protein puzzle: the consumption of meat, dairy and fish in the European Union. PBL – Netherlands Environmental Assessment Agency, The Hague, The Netherlands.

Zervas S. & Zijlstra RT. (2002). Effects of dietary protein and fermentable fiber on nitrogen excretion patterns and plasma urea in grower pigs. *Journal of Animal Science* 80 (12) 3247-3256.

7 ANEJOS

ANEJO 1. Composición en ingredientes de los piensos experimentales (g / kg, base fresca)

| | Dietas ^a | | | | |
|-------------------------------------|---------------------|-------|-------|---------|---------|
| | Control | 35CSP | 70CSP | 35CSPOP | 70CSPOP |
| Cebada en grano | 250 | 250 | 250 | 250 | 250 |
| Grano de trigo | 469 | 424 | 379 | 305 | 263 |
| Salvado de trigo | 101 | 111 | 121 | 0 | 0 |
| Melaza | 21.2 | 20.8 | 20.0 | 20.1 | 20.0 |
| Harina de soja 45 | 133 | 137 | 143 | 176 | 185 |
| Pulpa de naranja | 0 | 0 | 0 | 200 | 200 |
| Jabón cálcico de palma ^a | 0 | 35.0 | 70.0 | 35.0 | 70.0 |
| Carbonato de calcio | 14.9 | 8.10 | 1.80 | 2.40 | 0 |
| Cloruro de sodio | 1.27 | 1.54 | 1.91 | 1.30 | 1.12 |
| Fosfato monoódico | 6.83 | 7.25 | 7.30 | 7.18 | 7.16 |
| DL-methionina | 0.29 | 0.47 | 0.71 | 0.51 | 0.63 |
| L-lisina HCL | 1.99 | 2.41 | 2.70 | 1.67 | 2.04 |
| L-treonina | 0.52 | 0.71 | 0.80 | 0.55 | 0.50 |
| L-triptófano | 0 | 0.08 | 0.18 | 0.07 | 0.17 |
| L-valina | 0 | 0.34 | 0.60 | 0.12 | 0.38 |
| Premezcla ^b | 5.00 | 5.00 | 5.00 | 5.00 | 5.00 |

^aCSP = jabón cálcico de destilado de ácido graso de palma OP = pulpa de naranja.

^bVitamina y minerales premezcla suplementada por kg de dieta: 5000 IU de vitamina A; 1000 IU de vitamina D3; 3 mg de vitamina B2; 20 mg de vitamina B12; 10 mg de niacina; 4 mg de ácido pantoténico; 48 mg de betaína; 30 mg de óxido de manganeso; 110 mg de óxido de zinc; 10 mg de sulfato de cobre; 0,75 mg de yoduro de potasio; Selenito de sodio 0,1 mg; 90 mg de carbonato de hierro.

ANEJO 2. Composición química de los piensos experimentales (g / kg, base fresca)

| | Dietas ^a | | | | |
|---|---------------------|-------|-------|---------|---------|
| | Control | 35CSP | 70CSP | 35CSPOP | 70CSPOP |
| Materia seca | 905 | 905 | 909 | 899 | 889 |
| Ceniza | 45.0 | 46.4 | 47.8 | 49.4 | 52.1 |
| Proteína cruda | 146 | 145 | 147 | 146 | 144 |
| NDICP ^b | 16.1 | 15.8 | 21.0 | 20.9 | 26.3 |
| Extrato etéreo | 31.2 | 51.5 | 83.6 | 54.6 | 75.5 |
| Fibra soluble ^c | 28.4 | 44.0 | 37.7 | 95.6 | 106 |
| ADFom | 50.8 | 44.7 | 48.0 | 60.3 | 59.7 |
| ADL | 11.0 | 8.20 | 9.40 | 7.90 | 8.10 |
| Calcio ^d | 6.60 | 7.30 | 8.00 | 8.00 | 10.2 |
| Fósforo digestible ^d | 2.50 | 2.50 | 2.50 | 2.50 | 2.50 |
| Sodio ^d | 1.70 | 1.90 | 2.00 | 2.00 | 2.00 |
| Cloro ^d | 2.10 | 2.40 | 2.70 | 2.10 | 2.10 |
| Energía bruta (MJ/kg) | 16.3 | 16.8 | 17.7 | 16.7 | 17.2 |
| Energía neta (MJ/kg) ^d | 9.20 | 9.75 | 10.3 | 9.41 | 9.91 |
| <i>Ileal aminoácidos digestible^d</i> | | | | | |
| Lisina | 7.10 | 7.50 | 7.90 | 7.20 | 7.60 |
| Metionina | 2.20 | 2.40 | 2.60 | 2.30 | 2.60 |
| Azufre total | 4.60 | 4.70 | 4.90 | 4.50 | 4.70 |
| Treonina | 4.60 | 4.80 | 5.10 | 4.70 | 4.90 |
| Triptófano | 1.50 | 1.60 | 1.70 | 1.60 | 1.70 |
| Isoleucina | 4.90 | 4.90 | 4.90 | 5.00 | 5.00 |
| Valina | 5.57 | 6.10 | 6.40 | 5.80 | 6.20 |

^aCSP = jabón cálcico de destilado de ácido graso de palma; OP = pulpa de naranja

^bDetergente neutral insoluble en proteína cruda

^cCalculado del total de fibra diaria menos la fibra dietaria a NDF corregida por NDICP.

^dValores calculados de acuerdo FEDNA,2010.