



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA  
**LA MOLINA**



# Manual de procedimientos de colección de gases para la estimación de emisiones de metano entérico y óxido nítrico de origen ganadero



PROYECTO

**MEJORAMIENTO DE LOS SISTEMAS DE PRODUCCIÓN ANIMAL CON ÉNFASIS EN LA  
GANADERÍA DE LECHE EN LA REGIÓN ANDINA DENTRO DEL CONTEXTO DE CAMBIO CLIMÁTICO**



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA  
**LA MOLINA**



# Manual de procedimientos de colección de gases para la estimación de emisiones de metano entérico y óxido nítrico de origen ganadero



## PROYECTO

**MEJORAMIENTO DE LOS SISTEMAS DE PRODUCCIÓN ANIMAL CON ÉNFASIS EN LA GANADERÍA DE LECHE EN LA REGIÓN ANDINA DENTRO DEL CONTEXTO DE CAMBIO CLIMÁTICO**

## Autores

Haro Reyes, José Antonio<sup>1</sup>  
Mancipe Muñoz, Edgar Augusto<sup>2</sup>  
Sierra Alarcón, Andrea Milena<sup>2</sup>  
Avellaneda Avellaneda, Yesid<sup>2</sup>  
Vargas Martínez, Juan de Jesús<sup>2</sup>  
Mayorga Mogollón, Olga Lucía<sup>2</sup>  
Ñaupari Vásquez, Javier Arturo<sup>3</sup>  
Gómez Bravo, Carlos Alfredo<sup>3</sup>

1. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA).

2. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (CORPOICA).

3. Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM).

**Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA), 2018**



Manual de procedimientos de colección de gases para la estimación de emisiones de metano entérico y óxido nitroso de origen ganadero por IICA se encuentra bajo una Licencia Creative Commons.

Reconocimiento-Compartir igual 3.0 IGO (CC-BY-SA 3.0 IGO)

(<http://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0/igo/>)

Creado a partir de la obra en [www.iica.int](http://www.iica.int).

El Instituto promueve el uso justo de este documento. Se solicita que sea citado apropiadamente cuando corresponda.

Esta publicación también está disponible en formato electrónico (PDF) en el sitio Web institucional en <http://www.iica.int>

Coordinación editorial: José Haro Reyes

Diseño de contenidos: José Haro Reyes

Corrección de estilo: Javier Agreda Sánchez

Diagramado: José Enrique Torres Alarcón

Diseño de portada: José Enrique Torres Alarcón

Impresión: GMC Digital S.A.C.

Manual de procedimientos de colección de gases para la estimación de emisiones de metano entérico y óxido nitroso de origen ganadero / Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura, Universidad Nacional Agraria la Molina, Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria. – Lima: IICA, 2018.

32 p.; 29.7 cm x 21 cm

ISBN: 978-92-9248-781-2

1. Adopción de innovaciones 2. Ganadería 3. Emisiones de metano 4. Reducción de emisiones 5. Óxido nitroso 6. Medición 7. Gases 8. Región andina I. IICA II. UNALM III. CORPOICA IV. Título

AGRIS

Q70

DEWEY

363.738 74

Lima, Perú

2018

# Índice General

<b>1. Introducción</b>	7
<b>2. Flujo de procesos en experimentación para medición de metano entérico y óxido nitroso en ganadería</b>	9
<b>3. Colección de muestra de gases para la determinación de metano entérico</b>	11
3.1. Metodología de trazador SF <sub>6</sub>	11
3.2. Construcción de elementos de colección de metano entérico	11
3.2.1. Cápsulas de permeación de gas SF <sub>6</sub>	11
3.2.2. Jáquimas para vacunos	13
3.2.3. <i>Canister</i> de PVC	13
3.2.4. Línea de muestreo	16
3.2.5. Otras líneas anexas para conducción de gas	19
3.2.6. Generación de vacío de viales	20
3.3. Acondicionamiento y colección	23
3.3.1. Acondicionamiento de espacios	23
3.3.2. Acondicionamiento de animales	23
3.3.3. Procedimiento de colección de gases	24
<b>4. Colección de muestra de gases para determinación de óxido nitroso</b>	27
4.1. Metodología de cámara estática	27
4.2. Construcción de cámaras	27
4.3. Acondicionamiento y colección	29
4.3.1. Acondicionamiento del sitio experimental	29
4.3.2. Procedimiento de colección de gases	29
<b>5. Bibliografía</b>	32

# Índice de Figuras

<b>Figura N° 1.</b>	Flujo de procesos en experimentación para medición de metano entérico	9
<b>Figura N° 2.</b>	Flujo de procesos en experimentación para medición de óxido nitroso	10
<b>Figura N° 3.</b>	Ejemplo de curva de calibración de la cápsula de permeación ID 27	12
<b>Figura N° 4.</b>	Pesaje de cápsulas de permeación de SF <sub>6</sub>	12
<b>Figura N° 5.</b>	Esquema y medidas para construcción de jáquima para vacunos	13
<b>Figura N° 6.</b>	Partes del <i>canister</i> para vacuno, modelo en forma de "U" (iz.) y "V" (der.)	14
<b>Figura N° 7.</b>	Proceso de construcción de <i>canister</i> en forma de "V"	15
<b>Figura N° 8.</b>	Proceso de construcción de <i>canister</i> en forma de "U"	16
<b>Figura N° 9.</b>	Partes de la línea de muestreo	17
<b>Figura N° 10.</b>	Corte de tubo capilar	17
<b>Figura N° 11.</b>	Calibración del tubo capilar	18
<b>Figura N° 12.</b>	Líneas anexas para conexiones	19
<b>Figura N° 13.</b>	Partes de un vial	20
<b>Figura N° 14.</b>	Sistema de vacío de viales: Bomba de vacío conectada a tubería con válvulas para el vacío de viales	21
<b>Figura N° 15.</b>	Sistema de vacío de viales	21
<b>Figura N° 16.</b>	Formas de tapa de aluminio tras diferentes intensidades de crimpado	22
<b>Figura N° 17.</b>	Inserción de cápsulas de permeación en vacunos	23
<b>Figura N° 18.</b>	Acondicionamiento con jáquima y manguera temporal	23
<b>Figura N° 19.</b>	Colocación y ajuste de <i>canister</i> y línea de muestreo en el animal	24
<b>Figura N° 20.</b>	Detalle de ajuste de línea de muestreo con cintillos a nivel de ollares	25
<b>Figura N° 21.</b>	Proceso de control de presiones en los <i>canisters</i> durante colección de metano de animales experimentales	25
<b>Figura N° 22.</b>	Proceso de presurización y extracción de muestras de gases contenidos en <i>canister</i>	26
<b>Figura N° 23.</b>	Elementos de la cámara estática para colección de muestras de óxido nitroso	28
<b>Figura N° 24.</b>	Ubicación de cámaras estáticas en subparcelas	29
<b>Figura N° 25.</b>	Instalación de cámaras estáticas	29
<b>Figura N° 26.</b>	Toma de muestras de óxido nitroso en viales, procedente de gas recolectado en cámara estática	30
<b>Figura N° 27.</b>	Toma de información complementaria para interpretación de resultados y cálculos de flujo de emisión de óxido nitroso	31



## Agradecimientos

Al MSc Medardo Díaz Céspedes, a los estudiantes graduados Jorge Medrano Tinoco, Víctor Alvarado Bolovich y Meliza Villar Estrada por su aporte técnico en lo relacionado al metano. Asimismo, agradecer a los ingenieros Carlos Suquisupa Herrera y Lida García García por su similar contribución en lo relacionado al óxido nitroso.

A la administración y presidencia de la Cooperativa Agraria San Francisco de Chichausiri por su colaboración con la realización de los experimentos de medición de metano y óxido nitroso en su fundo ubicado en Junín (Perú) y su compromiso con la búsqueda de una ganadería sostenible.

A la Universidad San Antonio Abad de Cuzco (UNSAAC, Perú), el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIA Remehue, Chile), el Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE, Costa Rica) y al Dr. Nicolás DiLorenzo de la Universidad de Florida, por capacitar al equipo técnico del proyecto en las técnicas de cuantificación de metano entérico y óxido nitroso en sistemas ganaderos.

Al Dr. César Pinares, especialista internacional en Ganadería del AgriBusiness Group, y al Dr. Edgar Cárdenas Rocha, investigador de la Universidad Nacional de Colombia, por la lectura y revisión de pares del documento en el ámbito de cuantificación de metano entérico y óxido nitroso, respectivamente. Sus recomendaciones contribuyeron a la mejora del material publicado.





# 1 Introducción

Globalmente, la actividad ganadera es responsable de la emisión de gases de efecto invernadero (GEI) del orden de 7.1 Gt CO<sub>2</sub>-eq por año, que representan el 14.5% de las emisiones antropogénicas. El 44% de las emisiones ganaderas ocurren bajo la forma de metano (CH<sub>4</sub>) entérico (proceso de digestión) y un 29% bajo la forma de óxido nitroso (N<sub>2</sub>O), que desplaza en importancia al CO<sub>2</sub>, el GEI más importante emitido en otras actividades.

En el Perú, en el año 2012 se calculó que el sector ganadero aportaba alrededor de un 7% de las emisiones nacionales, estimadas en función a los factores de emisión de la metodología del Tier 1 del IPCC (MINAM, 2012). En aquella fecha había poca disponibilidad de la información ganadera nacional necesaria para alcanzar la aproximación Tier 2. En el mismo año, la ganadería de Colombia fue responsable del 9% de las emisiones nacionales (IDEAM *et al.*, 2016). A medida que se avanza en los Tier o “niveles” de complejidad y detalle para el cálculo de emisiones, aumenta la necesidad de información más puntual y regional, para pasar de la estimación a la proyección en base a la cuantificación real de las emisiones.

Ante la necesidad de reportar las emisiones nacionales de GEI con mayor precisión y evaluar estrategias para su reducción, el proyecto de Ganadería Andina “Mejoramiento de los sistemas de producción animal con énfasis en la ganadería de leche en la Región Andina dentro del contexto de cambio climático”, financiado por FONTAGRO, inició actividades en el 2015. Su finalidad es mejorar el posicionamiento de los países de la región

andina respecto a la cuantificación de las emisiones de metano entérico y óxido nitroso, así como las estrategias para su mitigación, con referencia a la ganadería lechera. El proyecto busca alcanzar estos objetivos ofreciendo a las instituciones y países la capacidad técnica para el muestreo y cuantificación de metano entérico y óxido nitroso en las condiciones de los Andes. También busca generar capacidad técnica para identificar, plantear y evaluar estrategias para su mitigación basadas en ajustes de la alimentación animal.

Respondiendo a la aspiración de establecer la capacidad técnica para la colección de gases y cuantificación de metano y óxido nitroso, el proyecto ejecutó durante el 2017 cuatro ensayos para la medición de metano entérico (tres en Perú y uno en Colombia) y dos ensayos para la medición de óxido nitroso (en Perú).

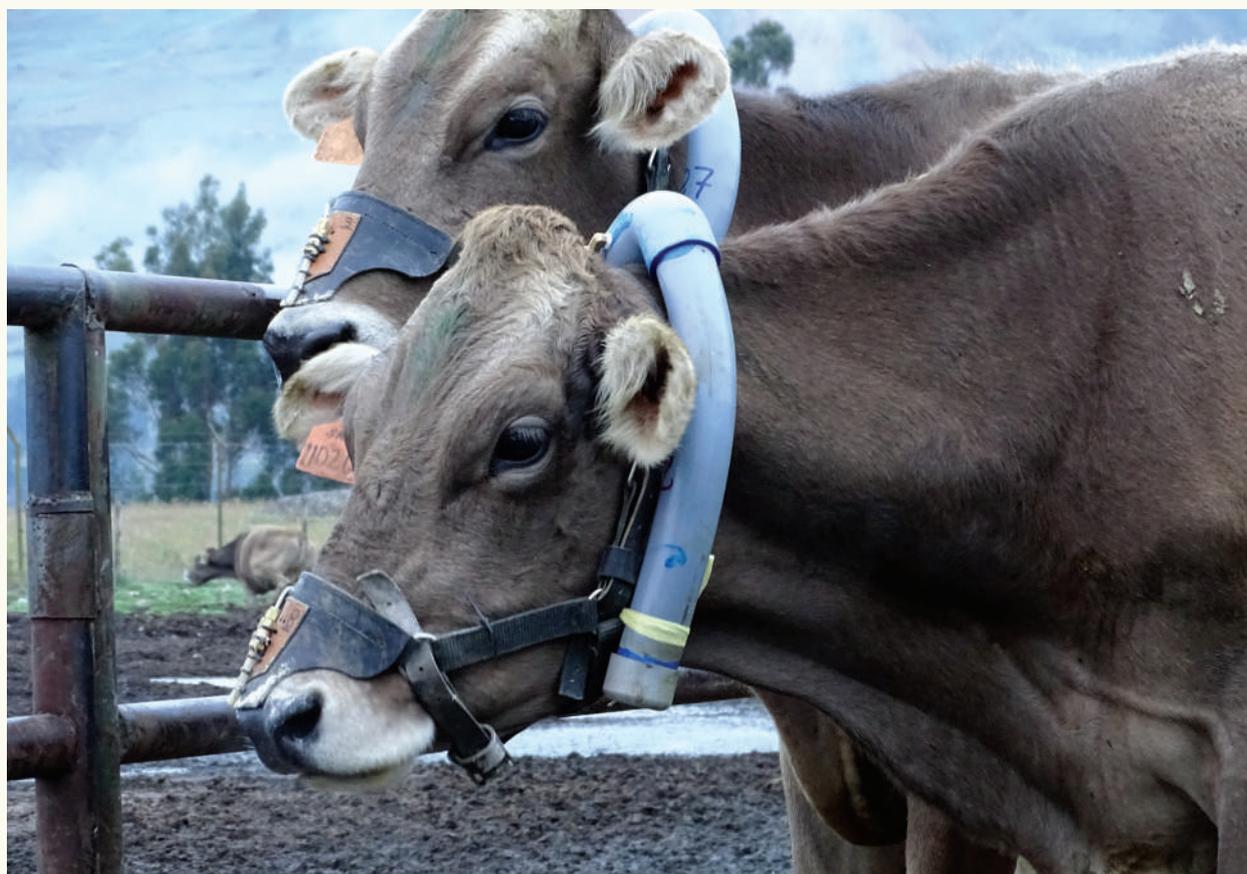
Los ensayos sirvieron de base para la aplicación de las técnicas del trazador de hexafluoruro de azufre (SF<sub>6</sub>) para la determinación de metano entérico en vacunos (Johnson y Johnson, 1995), incluidas las subsecuentes adaptaciones (Berndt *et al.*, 2014; Montenegro *et al.*, 2016), y las de las cámaras estáticas para la determinación de óxido nitroso (Klein y Harvey, 2015). El ensayo de medición de metano en el trópico alto colombiano se trabajó con vacunos al pastoreo, a 2560 m.s.n.m., bajo un sistema de manejo tradicional (pastoreo en kikuyo y balanceado comercial) y un sistema de suplementación estratégica (pastoreo en kikuyo y suplemento preparado a mínimo costo). Los ensayos de medición de metano en

el Perú comprendieron evaluaciones en: (1) un sistema intensivo de ovinos a nivel del mar, probando dos niveles de carbohidratos no estructurales (30 y 50%, base seca) en la dieta; (2) un ensayo con vacunos al pastoreo en la sierra central, en un sistema tradicional (pastizales naturales) a 4100 m.s.n.m.; y (3) un ensayo con vacunos al pastoreo en la sierra central, en un sistema mejorado –pasturas de alfalfa y avena, y concentrado comercial– a 3200 m.s.n.m. Los ensayos de medición de óxido nitroso se efectuaron en un sistema tradicional (pastizales naturales) y mejorado (asociación rye grass perenne con trébol blanco), a 4100 m.s.n.m.

Este manual documenta la experiencia práctica en la aplicación de las mencionadas técnicas de medición de metano y óxido nitroso, enfocándose en los procesos de

construcción de los elementos de colección de gases, el acondicionamiento experimental y el procedimiento de colección de muestras de gases en el campo. Estos puntos resultan críticos en la aplicación de la metodología de medición, y requieren soluciones particulares en función a las condiciones experimentales y los recursos disponibles en el lugar donde se lleven a cabo.

El manual está dirigido a aquellos técnicos y profesionales que se iniciarán en la actividad de medición de metano y óxido nitroso de origen ganadero. Esta publicación es un documento introductorio y un complemento de los manuales y publicaciones científicas ya existentes, y precisa las adaptaciones técnicas particulares para los ensayos realizados en el proyecto.



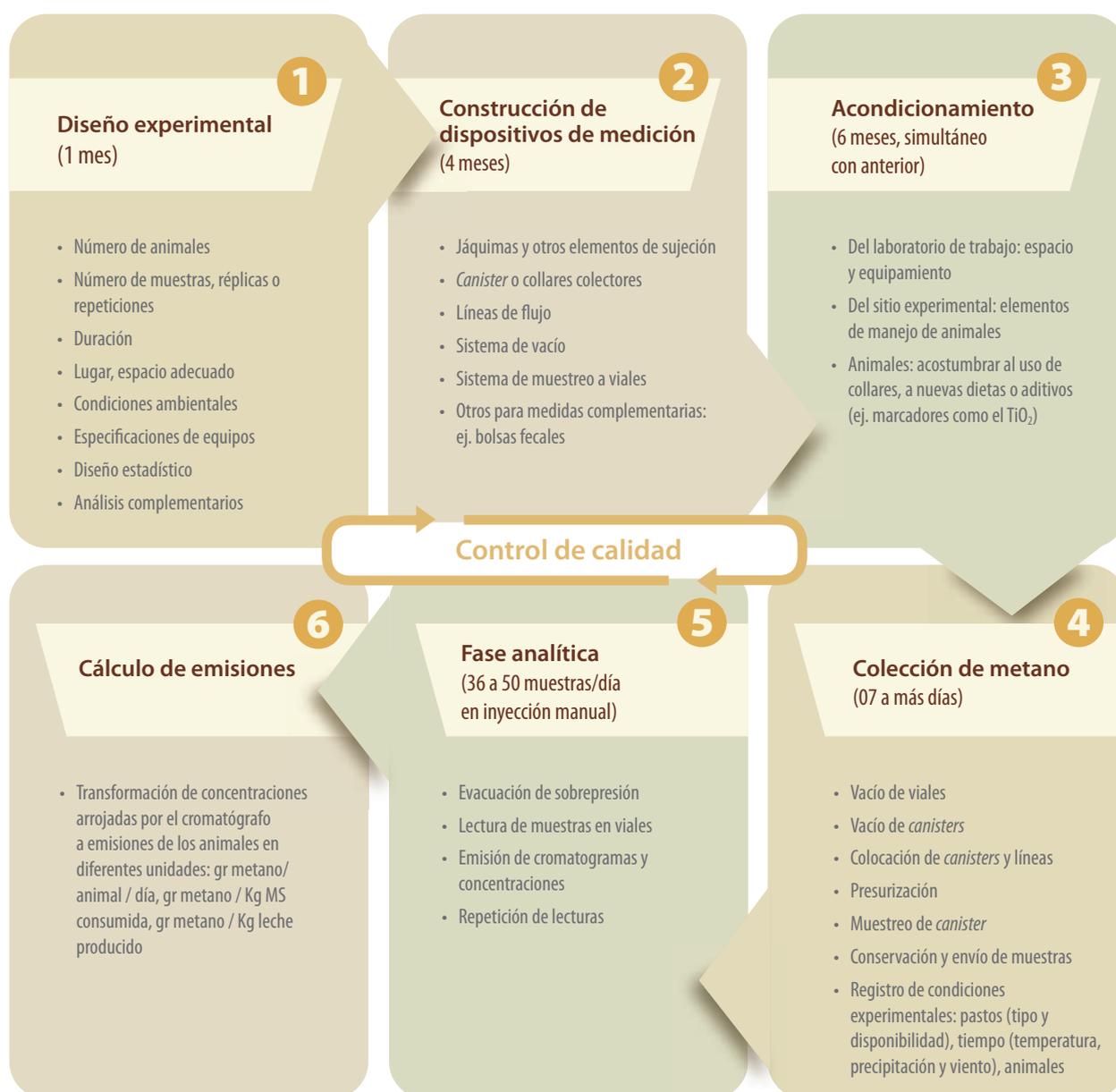
## 2 Flujo de procesos en la experimentación para la medición de metano entérico y óxido nítrico en ganadería

Para el desarrollo de las mediciones de metano entérico y óxido nítrico en sistemas ganaderos se han considerado los procesos (ver diagramas en Figura N° 1 y Figura N° 2), que van desde el diseño del experimento –que es clave para la planificación de recursos, tiempo y espacios– hasta los procesos para el cálculo de las emisiones –en base a las concentraciones de gases obtenidas por

cromatografía– y las medidas complementarias de cada experimento.

En el presente manual solamente se incluye el detalle de la construcción de elementos de colección, acondicionamiento y colección, por ser las partes del proceso en las que se han hecho las mayores adaptaciones para las condiciones locales.

Figura N° 1. Flujo de procesos en experimentación para la medición de metano entérico



**Figura N° 2.** Flujo de procesos en experimentación para medición de óxido nitroso



# 3 Colección de muestra de gases para la determinación de metano entérico

## 3.1. Metodología de trazador SF<sub>6</sub>

La técnica consiste en dosificar al animal con una cápsula de bronce cargada con SF<sub>6</sub> en estado gaseoso (conocida como "cápsula de permeación") y calibrada (para conocer su tasa de permeación). Una vez en el retículo-rumen del animal, se asume que la cápsula libera el gas SF<sub>6</sub> a tasas exactamente iguales a la conocida por la calibración. La técnica también asume que las rutas de excreción del SF<sub>6</sub> liberado en el rumen son las mismas que las de los gases de fermentación (CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, H<sub>2</sub> y otros) –es decir, por la boca y nariz– y que la fuente única de CH<sub>4</sub> es la digestión de materia orgánica en el tracto digestivo. Entonces, las alícuotas de los gases respirados (expirados) y eructados –muestreados continuamente alrededor de la boca y nariz del animal durante un ciclo de alimentación (generalmente ciclos de 24 horas) y subsecuentemente analizados por concentraciones de SF<sub>6</sub> y el CH<sub>4</sub> entérico–, en conjunción con la tasa de liberación de SF<sub>6</sub> de la capsula de permeación serían suficientes para la determinación de las emisiones de CH<sub>4</sub> durante el periodo de colección de muestra.

La técnica del trazador SF<sub>6</sub> involucra la captura de los gases mediante el uso de una línea de muestreo que va desde el exterior de los ollares del animal hacia un "canister" colector (p. ej., un collar de PVC en el cuello del animal). El flujo es accionado por efecto del vacío existente en el canister evacuado (es decir, con vacío o presión negativa), mientras que la tasa de colección es determinada por un controlador de flujo inserto en la línea de muestreo. Las concentraciones de SF<sub>6</sub> y CH<sub>4</sub> en la muestra colectada en el canister se analizan usando cromatografía de gases, para la cual se obtienen submuestras de gas (previa presurización con N<sub>2</sub>) en un vial o vacutainer. El cálculo de las emisiones de un animal en particular y durante un periodo particular de colección (generalmente 24 horas) se hace con el producto de la tasa de liberación de SF<sub>6</sub> (g/d), proveniente de la cápsula, por la razón de concentraciones de gases de CH<sub>4</sub> / SF<sub>6</sub> (ppt/ppt) y un factor que iguala las masas moleculares.

Esta técnica permite la cuantificación diaria de por animal. Es internacionalmente reconocida como la más apropiada para estimar las emisiones de metano en sistemas de pastoreo, en virtud de que los elementos de colección de muestra que son instalados en el animal no impiden la conducta natural ni el movimiento del animal (Johnson *et al.*, 2007; Lassey *et al.*, 1997; Woodward *et al.*, 2004; Grainger *et al.*, 2007). Aunque la aplicación de la técnica SF<sub>6</sub> puede ser limitada por los altos costos de implementación, su mayor ventaja es la obtención de valores de emisión de animales individuales y en condiciones similares a las condiciones de producción.

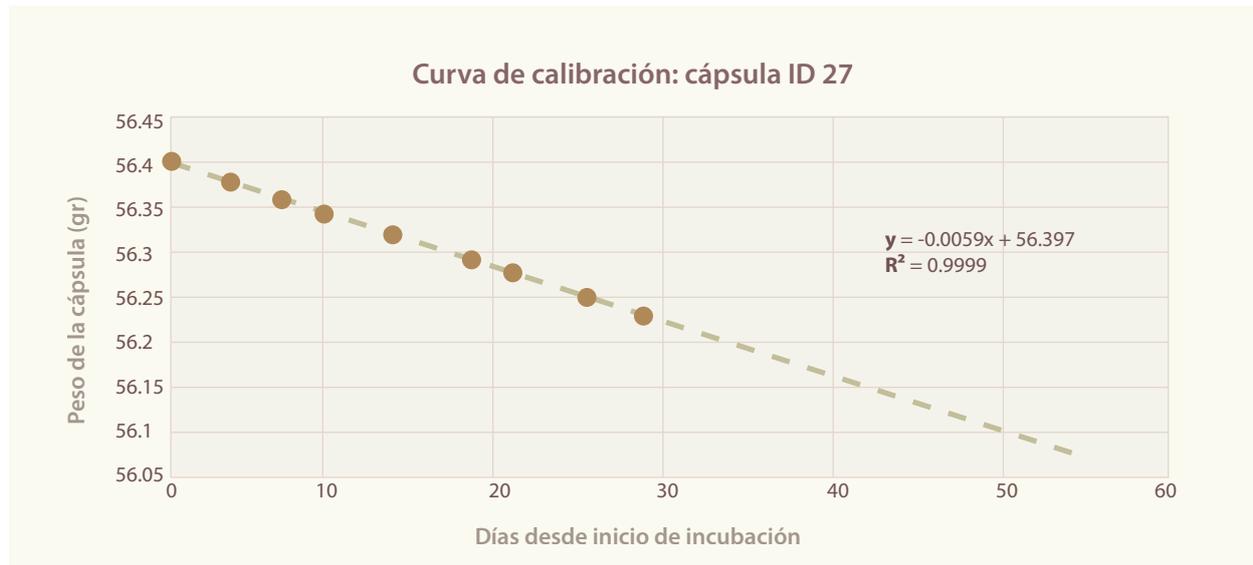
## 3.2. Construcción de elementos de colección de metano entérico

### 3.2.1. Cápsulas de permeación de gas SF<sub>6</sub>

Las cápsulas o tubos de permeación son construidos de bronce y se cargan (usando nitrógeno líquido como medio) con una cantidad conocida de SF<sub>6</sub> que, una vez calibradas, van liberando periódicamente de manera constante. Las capsulas para vacunos tienen un cuerpo cilíndrico (aprox. 45 mm longitud), con un hueco en el interior y una rosca (tapa) Swagelok de 9.5 mm de abertura. En la tapa del tubo se aloja un tapón permeable al gas, constituido por una membrana de politetrafluoroetileno (PTFE) soportada por una septa metálica sinterizada y altamente porosa, de 1.6 mm de espesor y tamaño de poro de 2 µm (Lassey *et al.*, 2001). Las cápsulas para vacunos tienen una masa en el rango de 53.7 - 56.8 g (sin carga) y son cargadas con aproximadamente 2.2 - 2.8 g de SF<sub>6</sub>. Pueden tener tasas de permeación (referida a la liberación de SF<sub>6</sub>) en el rango de 3 - 7 mg SF<sub>6</sub>/día, dependiendo de la carga y porosidad del elemento de permeación (Berndt *et al.*, 2014).

Las tasas de permeación de los tubos fueron determinadas en el lugar de experimentación, como la pendiente entre los pesajes de las cápsulas y el tiempo de calibración. En la calibración las cápsulas son almacenadas en un incubador o estufa a 39°C, para asemejar la temperatura del rumen, y pesadas con una frecuencia interdiaria o semanal, de modo que se establezca en el tiempo la tasa diaria de pérdida de SF<sub>6</sub> (g/d). Se recomienda que la determinación de la pendiente (que representa la disminución de los pesos en el tiempo) sea realizada en un proceso de 6 a 10 semanas (Berndt *et al.* 2014). Las cápsulas que se seleccionan para ser utilizadas en los animales son aquellas que presentan una pendiente con coeficientes de determinación (R<sup>2</sup>) mayores de 0.9995 (Lassey *et al.* 2001).

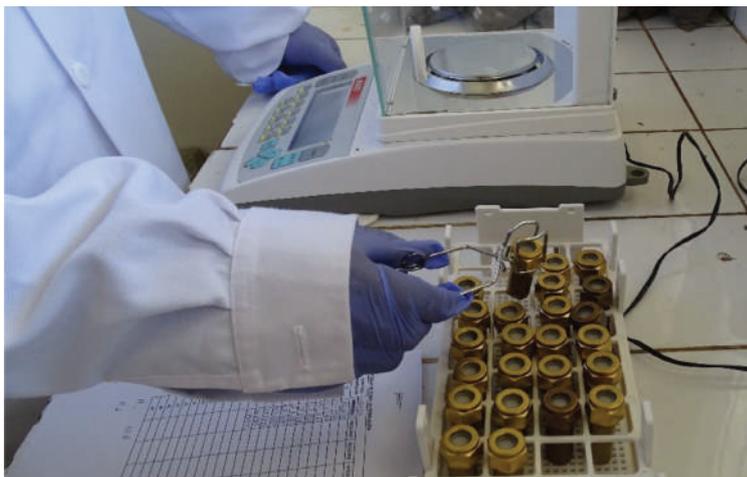
Las cápsulas usadas para el experimento de Colombia fueron provistas por Dr. Nicolás di Lorenzo de la Universidad de Florida (USA), las mismas que fueron calibradas durante 6 semanas en el lugar de procedencia y 9 semanas en el lugar de experimentación (2560 msnm). En el caso de las cápsulas para Perú, se obtuvieron del Dr. Alan Iwaasa, Agriculture and Agri-Food Canada (Canadá) y fueron calibradas 2 semanas en el lugar de elaboración y 4 semanas en el lugar de experimentación (3100 msnm).



**Figura N° 3.** Ejemplo de curva de calibración de la cápsula de permeación ID 27.

Los puntos indican el peso de la cápsula durante los días de calibración. La línea punteada es una proyección de la curva de calibración en el tiempo, que permite visualizar la disminución de peso de la cápsula en el tiempo (corresponde al SF<sub>6</sub> que se va liberando). La pendiente muestra que la tasa de permeación de SF<sub>6</sub> es de 0.0059 g/d. La tasa de permeación no continúa lineal infinitamente hasta agotar la carga de SF<sub>6</sub> pues es vulnerada paulatinamente por las condiciones en el retículo-rumen.

Para el pesaje de las cápsulas se recomienda la utilización de pinzas metálicas y guantes de nitrilo. Así se evita el contacto directo con ellas para no interferir con el peso, pues las diferencias son muy pequeñas y se observan sólo con balanza analítica. En climas con alta humedad es recomendable el uso de un desecador para colocar las cápsulas al retirarlas de la estufa. Para lotes grandes se debe hacer grupos y pesar por grupos.



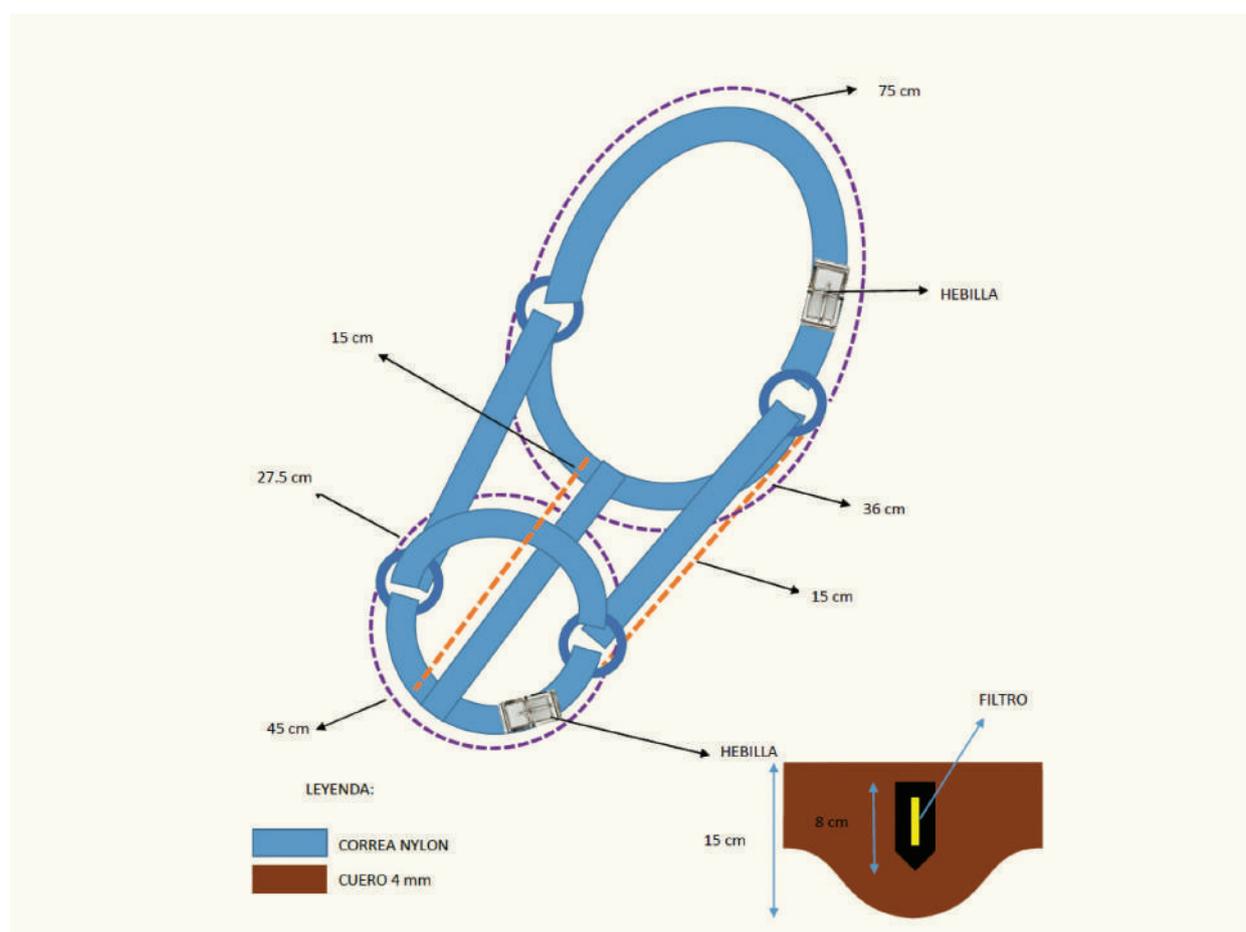
En el ensayo de Colombia las cápsulas mostraron una tasa de liberación de  $2.031 \pm 0.135$  mg SF<sub>6</sub>/día (a una presión ambiental de 752 mbar). En los ensayos de Perú se observó, en cápsulas de la misma procedencia, tasas de liberación promedio de  $5.220 \pm 0.712$  y de  $5.203 \pm 0.905$  mg SF<sub>6</sub>/día. Las cápsulas fueron calibradas a 3200 m.s.n.m. (680 mbar) y a nivel del mar (1009 mbar), respectivamente.

**Figura N° 4.** Pesaje de cápsulas de permeación de SF<sub>6</sub>.

La tasa de permeación calibrada se obtiene en base al cambio en la masa de las capsulas durante el proceso de calibración.

### 3.2.2. Jáquimas para vacunos

Las jáquimas son los elementos de soporte tanto para sostener el *canister* o contenedor de colección como la línea de muestreo. Se recomienda su confección en cuero o materiales resistentes, como el nylon. Lo más importante es que las jáquimas deben amoldarse bien a la anatomía de los animales (p. ej. vacuno de carne vs. vacuno de leche, animal joven vs. adulto, etc.) sin que restrinjan la conducta normal de los animales. Tampoco deben presentar riesgos para los animales (p. ej., el de ser atrapadas en los cercos, o que resulten un obstáculo para la visibilidad, pastoreo o rumia). En la Figura N° 5 se muestran las dimensiones de las jáquimas empleadas para los animales en el presente estudio.



**Figura N° 5.** Esquema y medidas para construcción de jáquima para vacunos.

*Las jáquimas deben ser ajustables para cada un tipo o clase de animal, ya que no todos los animales tendrán anatomías uniformes de cara, ollares o cabeza. Las dimensiones mostradas son una referencia para el ensayo en Perú, pero deben adaptarse a los animales de cada experimento.*

### 3.2.3. Canister de PVC

#### Materiales a emplear:

- Codo 90° 2" SP 60mm PVC-U (Marca PAVCO) (Figura N° 6 – A)
- Tubos de PVC-U PRESION 50 mm, 2", PN 10 Rosca NTP (ej. marca PAVCO) (Figura N° 6 – B)
- Tapones 2" PVC – C 10 S/P (Figura N° 6 – C)
- Codo macho de latón, 1/4 pulg. NPT macho. Modelo: B-4-ME (Figura N° 6 – D)
- Base enchufe rápido instrumentación de latón, Cv 0.2, 1/4 pulg. NPT hembra. Modelo: B-QC4-B-4PF (Figura N° 6 – E)
- Manguera de silicona 1/4" (Figura N° 6 – F)
- Macho/fresa de roscar (para hacer hilo) 1/4 - 18. Marca: Black Cross
- Pegamento azul para PVC
- Teflón en rollo de 1/2" pulg. X 7.32 m. Código: MS-STR-8

Existen diversos diseños de *canister* (cilindros, collares, montura, tubo, etc.), pero los criterios para su elección radican en que deben ser hechos para minimizar el daño físico, cómodos para el animal y que el ajuste de sus piezas garantice el sellado hermético. En el caso del experimento con vacunos en Colombia se utilizó un *canister* en forma de "U", y en Perú uno en forma de yugo o "V".

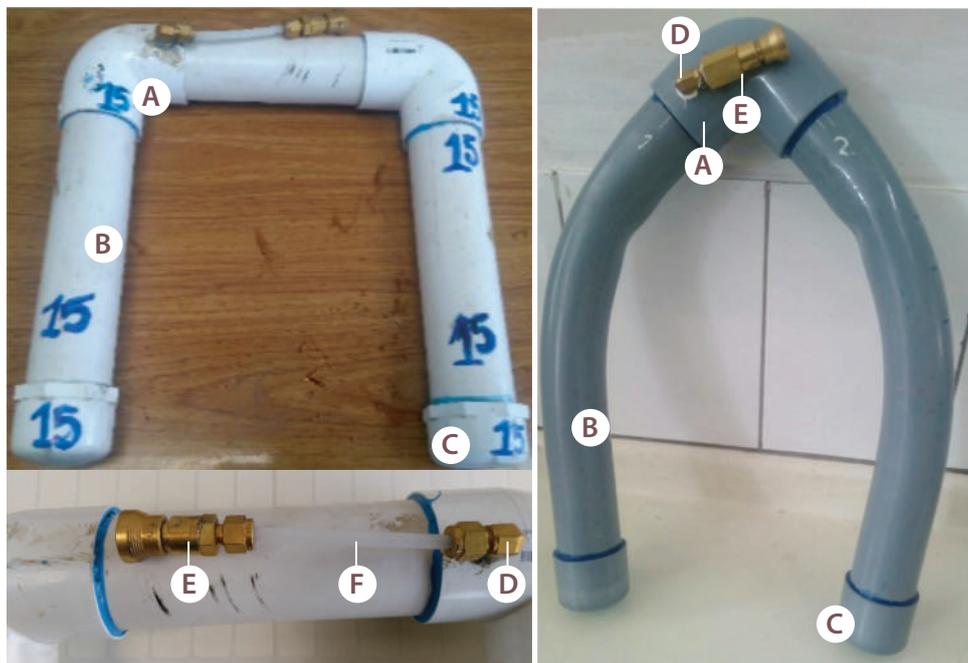


Figura N° 6. Partes del *canister* para vacuno, modelos en forma de "U" (iz.) y "V" (der.).

#### Pasos para la construcción de *canister* en forma de "V" para vacunos adultos:

- Cortar los tubos de PVC en pedazos de 50 cm (Figura N° 7 - A). Se recomienda el uso de una amoladora y equipos de protección (guantes de cuero, mascarillas con filtro y lentes) debido al polvillo que se desprende al realizar los cortes.
- Para armar un collar se usarán dos piezas de tubo y un codo. Se recomienda pegar interiormente un anillo de tubo de 5 cm (Figura N° 7 - B). Esto ayudará a tener una mayor superficie para la inserción del codo metálico que conectará con la línea de muestreo.
- Rayar con una lija los extremos de los tubos en los que se conectarán y aplicar pegamento a la parte que será acoplada al codo. Se debe asegurar que el pegamento sobresalga de los elementos pegados (Figura N° 7 - H), pues también sirve para sellar de forma externa cualquier posible espacio para evitar la entrada/salida de aire.
- El codo acoplado a los tubos permanece entre 1 y 3 días, para un buen secado y sellado. Esto dependerá del producto local con el que se trabaje y la temperatura del ambiente.
- Una vez seco, se coloca el elemento en la estufa a 120°C por 3 minutos (Figura N° 7 - C) o hasta que el material sea moldeable. El tiempo y la temperatura pueden variar. Se busca que el tubo no se deforme al tocarlo, pero que sí pueda ser doblado. Depende mucho de la calidad del tubo y de parámetros que deben ajustarse localmente. Todo el proceso con el tubo al entrar y salir de la estufa se trabaja con guantes gruesos.
- Al salir de la estufa el tubo es inmediatamente colocado en un molde de madera, que guíe la forma final deseada del *canister*, y se introduce en él resortes metálicos (Figura N° 7 - D). Estos resortes ayudan durante la manipulación y doblado del tubo para que no se deforme por la presión de las manos. En este momento se dobla el tubo para dar la forma en "U" al collar deseado (Figura N° 7 - E). Se pasa un paño o esponja con agua fría sobre los puntos de dobles para que vayan quedando duros, se retiran los resortes y se tapa provisionalmente las salidas inferiores del tubo.
- El tubo se sumerge en un balde de agua fría (Figura N° 7 - F), para garantizar que tome la forma deseada, y luego nuevamente se coloca en el molde y se retiran las tapas.
- Al lado izquierdo del codo se realiza una perforación con la broca de ¼" para plástico/metal, con un taladro de banco (o un taladro con un soporte fijo, pues la idea es que el agujero sea recto) y se marca el hilo con el macho de roscar de manera manual (Figura N° 7 - G). Esto genera residuos de plástico en el *canister* que deben ser eliminados. El proceso finaliza colocando las tapas y sellándolas con pegamento (Figura N° 7 - H).

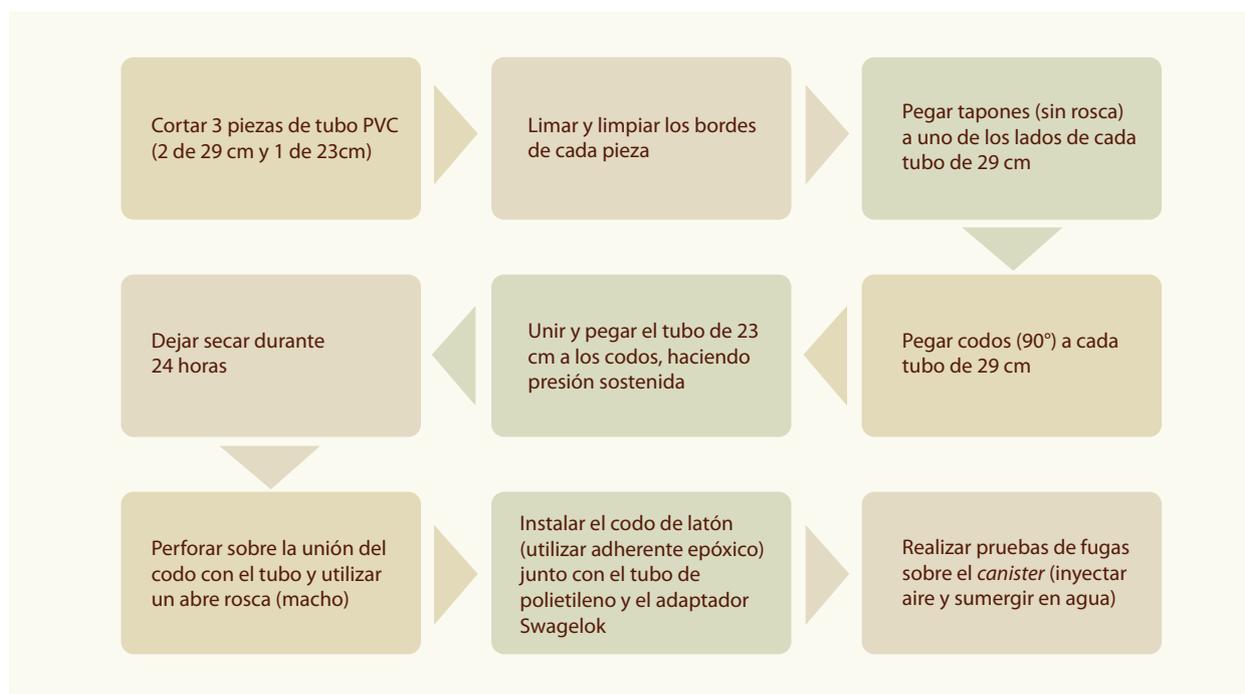
### Construcción de *canister* en forma de "U" para vacunos adultos:

El flujo de construcción de los *canisters* en forma de "U" se presenta en la Figura N° 8. Algunos detalles que se deben tener en cuenta durante la elaboración son los siguientes:

- El cuerpo del *canister* lo forman dos tubos: uno de 29 cm y otro de 23 cm.
- No se utilizan refuerzos internos en los codos.
- Se pegan a los tubos primero las tapas y en segundo lugar los codos. Se deja secar por 24 horas y después se hace el agujero y la instalación de conectores.
- Se utiliza una manguera de silicona (Figura N° 6 – F) entre el codo macho y la base enchufe de latón para dar flexibilidad al momento de la colección de muestras.
- La forma en "U" reduce las posibilidades de fugas causadas por modificaciones en la forma del tubo por efecto del calor, como las presentadas en el caso del modelo en "V".



Figura N° 7. Proceso de construcción de *canister* en forma de "V".



**Figura N° 8.** Proceso de construcción del *canister* en forma de "U".

### 3.2.4. Línea de muestreo

#### Materiales

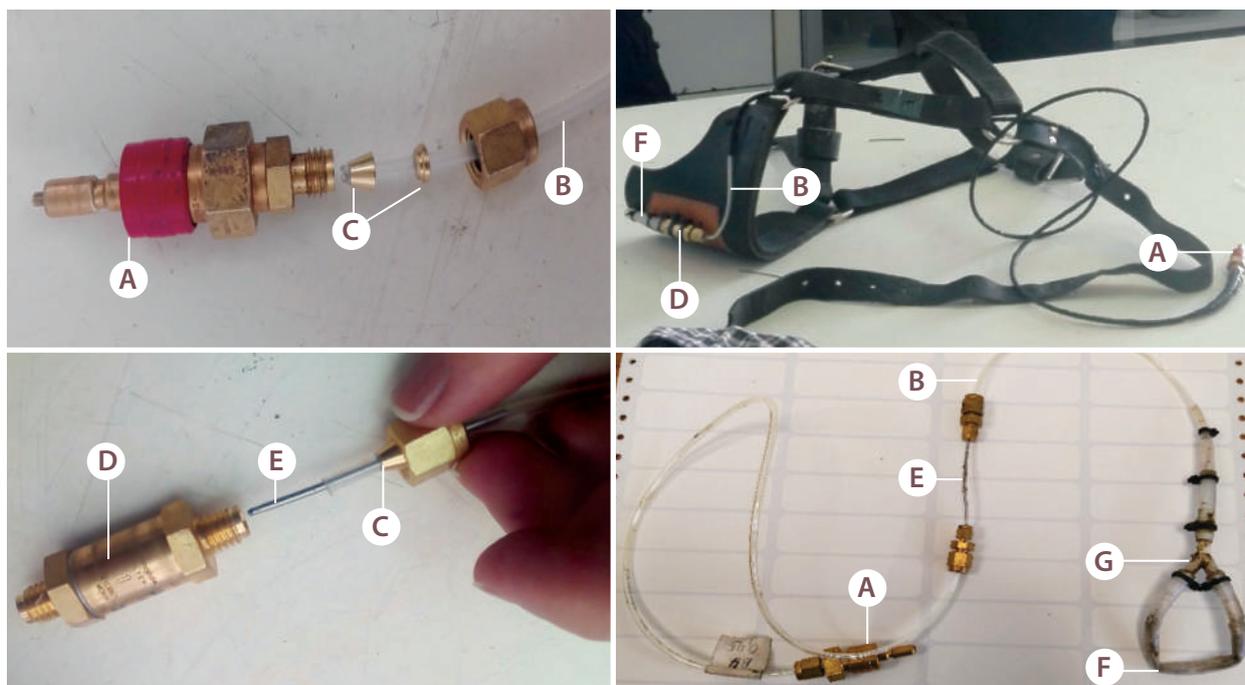
- Conector macho o espiga de enchufe rápido. Instrumentación con válvula (Código: B-QC4-D-200, Marca: Swagelok) (Figura N° 9 - A)
- Manguera de Nylon de 1/8" (Código: NYBG-0108, Marca: GRIFLEX) (Figura N° 9 - B)
- Férulas de latón 1/8" (OD) (Código: B-200-SET, Marca: SWAGELOK) (Figura N° 9 - C)
- Filtro de partículas en línea de latón, 1/8", tamaño de poro: 15 µm (Marca: Swagelok) (Figura N° 9 - D)
- Tubo capilar de cromatografía. Tubos capilares o Capillary Tubing × 1/16" (OD) × 0.005" (ID) (Figura N° 9 - E)
- Manguera de silicona de 5 mm diámetro interno (grado médico) (Figura N° 9 - F)
- Tubo de plástico en "Y" (Figura N° 9 - G)
- Cintillos delgados
- Tornillo de banco de 3 pulgadas.

#### Equipos

- Flujómetro. Marca: Cole-Parmer, modelo: CP-32908-53. Máxima presión: 145 psi, tasa de flujo mínima: 0.05 ml/min, tasa de flujo máxima: 5 ml/min
- Manómetro. Marca: Control C, código: 3462. Rango presión: -30 a 30 psi, resolución: 0.02 psi

Las líneas de muestreo son los elementos que conectan el *canister* con los ollares del animal. Llevan el aire mezclado con los productos de la fermentación entérica y gases respiratorios, que contiene CH<sub>4</sub> y SF<sub>6</sub>, hasta el recipiente de colección; y a una tasa determinada, que decrece a medida que el vacío en el *canister* se va agotando. Esta tasa es regulada por el tubo capilar o capilar de cromatografía (Figura N° 9 - E).

En la Figura N° 9 pueden observarse las piezas que conforman la línea y el orden en que se colocan. Las piezas Swagelok que se emplean sólo necesitan ajustarse bien. No llevan teflón para gas entre ellas, a diferencia de otras piezas que pueden unirse al PVC (u otra pieza que no sea Swagelok). El ajuste de las rosas de todos los elementos debe hacerse con las llaves correspondientes a las medidas. El diseño de la línea de flujo utilizada en el ensayo de Colombia no utiliza un filtro de partículas, sino una manguera de silicona en forma de "U". Esta manguera se conecta al final de la línea (Figura N° 9 - F, imagen inferior derecha) para evitar la captura de partículas sólidas.

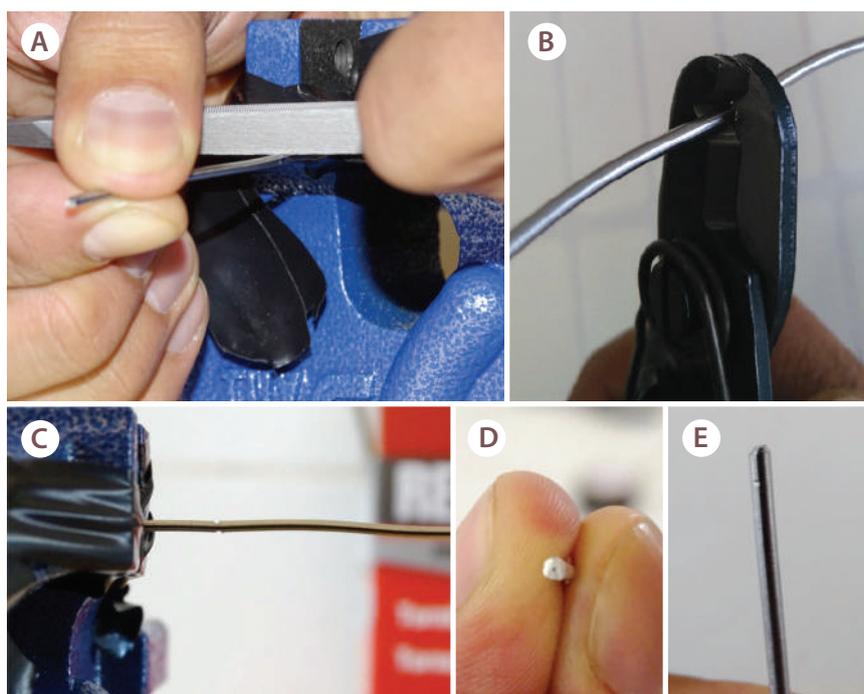


**Figura N° 9.** Partes de la línea de muestreo.

La imagen superior derecha muestra la línea de muestreo utilizada en el experimento de Perú, mientras que la imagen inferior derecha muestra la que se usó en Colombia.

**Calibración de capilares:** Es un paso previo a la colocación del capilar en la línea de muestreo. Busca asegurar la tasa de ingreso de la muestra gaseosa al *canister*, garantizando un flujo controlado que asegure la colección de una muestra representativa por 24 horas. A pesar de que la tasa de muestreo decrece con el tiempo de colección, estudios conducidos en ovinos por Lassey *et al.* (1997), que involucraron muestreos frecuentes, indicaron que las emisiones de CH<sub>4</sub> y SF<sub>6</sub> a lo largo de un ciclo de alimentación (24 horas) eran paralelas, posiblemente debido a la gran importancia de la eructación en la excreción de estos gases.

Primero se corta una porción de 5 cm de capilar, con ayuda de un tornillo de banco y una lima triangular o una pinza, en la forma observada en la Figura N° 10. La lima permite hacer un corte limpio que no interfiere con el agujero interno del capilar, lo cual no se logra con un alicate de corte convencional. Luego se calibra el flujo de pasaje de gas por el capilar, reduciendo su diámetro interno o luz, mientras está conectado por un extremo a un flujómetro, que permite medir el volumen de aire que pasa en un tiempo determinado.



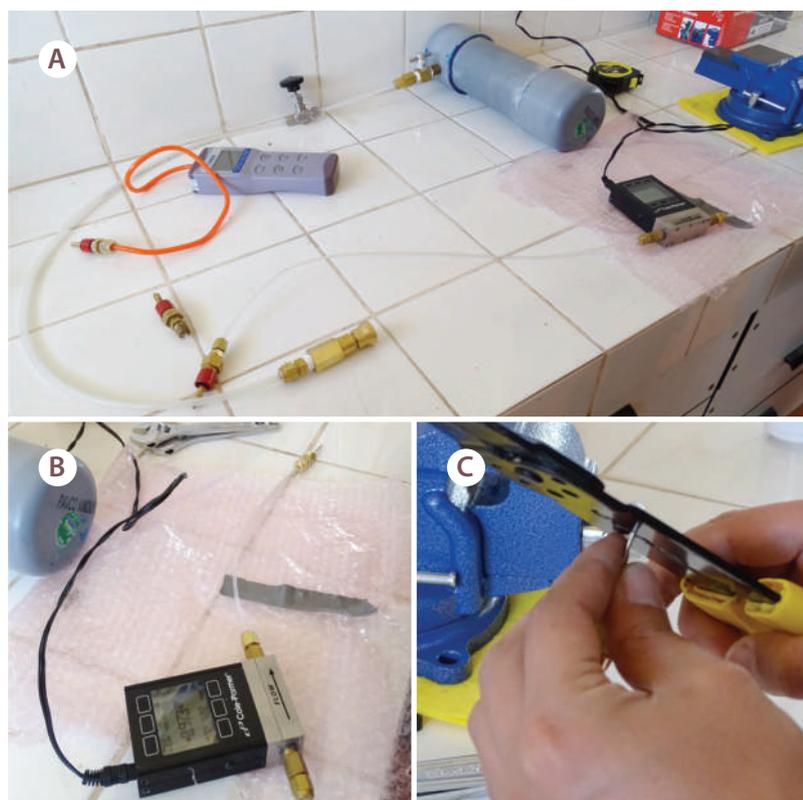
**Figura N° 10.** Corte de tubo capilar.

- A. Corte utilizando lima triangular.
- B. Corte utilizando una pinza.
- C. Estilo de corte; se hace una parte del corte por la cara superior y la otra por la cara inferior.
- D. Orificio interno del capilar.
- E. Forma trapezoide de la punta cortada.

El flujómetro posee una entrada y una salida por donde pasa el flujo de aire. El tubo capilar es conectado con una línea de nylon a la salida del flujómetro (Figura N° 10 – B). En la entrada se conecta una línea que viene de un tanque con nitrógeno UHP a sobrepresión de 800 mbares. Al abrir la llave de paso del tanque, el gas pasa por el flujómetro, sale por el capilar y el equipo registra el flujo de paso en CCM (centímetros cúbicos por minuto). El capilar entonces es calibrado sujetándolo con un tornillo de banco de 3" y constriñendo la punta con un alicate para cables. Así, se espera reducir el flujo hasta 0.35, 0.90 ó 0.95 CCM, según sea el caso; tomando como ejemplo lo usado en Perú, a nivel del mar con ovinos, a 3,200 y a 4,100 m.s.n.m. con vacunos. La interacción profesional, posterior a la ejecución experimental, ha permitido identificar que existe una práctica de calibración que se asemeja más al funcionamiento del capilar durante la experimentación. En lugar de usar gas a sobrepresión, el capilar es conectado a un *canister* con presión de vacío, de modo que el flujo de aire que recorre el capilar es originado por el vacío. Tal como ocurre en las líneas de muestreo en los animales.

El flujo referencial para calibrar el capilar se calcula en función al volumen del *canister* que se espera llenar. Si el *canister* tiene un volumen de dos litros y deseamos que se llene alrededor de un 40% en un día, entonces el flujo sería de 0.56 CCM. En la práctica, para determinar el flujo que llenará el volumen esperado se debe proceder de la siguiente forma: si quiero que el *canister* se llene un 40% y el flujo teórico es de 0.56 CCM, se recomienda calibrar 21 capilares con flujos cercanos, a 0.40, 0.45, 0.50, 0.56, 0.6, 0.65 y 0.70 CCM (3 capilares de cada uno). Estos se conectan con sus respectivas líneas y *canisters* con vacío, para luego de 24 horas exactas medir el llenado. Es probable que el llenado deseado (40%) se logre con alguno de los flujos probados, pero puede buscarse mayor exactitud. Si, por ejemplo, el llenado más cercano al 40% está entre los capilares calibrados a 0.6 y 0.65 CCM, entonces pueden calibrarse 18 capilares más con los siguientes flujos: 0.6, 0.61, 0.62, 0.63, 0.64 y 0.65 CCM (3 de cada uno). Y luego de 24 horas, se obtendrá un flujo más preciso para utilizar en el experimento. Sin embargo, esto es bastante teórico, pues difícilmente se logrará el llenado exacto. Eso se debe a que los *canisters* varían en volumen, las líneas varían de diámetro y el nivel de vacío no es el mismo. Por ello, lo ideal sería considerar un rango de volumen de llenado esperado de 35% a 40%, por ejemplo.

En condiciones de altura el flujo no trabaja de la misma forma. Por ello se utilizan flujos de 0.90 o 0.95 CCM, en lugar de 0.56 CMM, para llegar a llenar cerca del 40% de un *canister* de 2 litros. En altura, el flujo se determina probando el llenado de los *canisters*, en función de las diferencias entre el vacío inicial y final. Así, si queremos llenar aproximadamente el 40% del *canister*, debemos escoger el flujo que nos reduzca el vacío; por ejemplo, de -670 mbar a -402 mbar en 24 horas.



**Figura N° 11.** Calibración del tubo capilar.

- A. Elementos de calibración, tanque con llave de paso que finaliza en enchufe hembra, flujómetro negro con entrada, que termina en un conector macho y conducto de salida.  
 B. Flujómetro con vía de salida que termina en conector con capilar.  
 C. Alicata para cable, con el que se constriñe el capilar.

En el caso de la línea para calibración del capilar, se utiliza un pequeño tanque hecho de tubo de alta presión, a semejanza de los *canisters*, con una válvula macho B-4P4T2-M2 (Swagelok) y conectores hembra B-400-7-4 (Swagelok) que sirven como llave de ingreso y salida del tanque. Esta salida se conecta con tubo de nylon de 1/8" a una válvula de aguja SS-1RS4 (Swagelok) que hace las veces de llave de paso, y el tubo se extiende hasta un enchufe rápido hembra B-QC4-B-4PF (Swagelok). Esto permite que tanto el tanque como el flujómetro se conecten con un conector macho simple de 1/4", similar al usado en la línea de muestreo.

### 3.2.5. Otras líneas anexas para conducción de gas

Esta sección describe otras líneas de conducción de gas para diversas funciones dentro del proceso de construcción de los elementos de colección de gases, así como para el momento de la colección.

A continuación, se indican los procesos en los que son necesarias estas líneas:

- Flujo para calibración de capilar. Conecta un tanque pequeño con una llave de paso hasta la entrada del flujómetro, para garantizar el flujo de aire para la calibración del tubo capilar (Figura N° 11 - A y B).
- Vacío de *canister*. Línea que conecta el *canister* con la bomba de vacío (Figura N° 12 - A).
- Control de presión de *canister*. Línea que conecta el *canister* con un manómetro digital (Figura N° 12 - B).
- Presurización del *canister* con N<sub>2</sub>. Línea que conecta el balón de nitrógeno con el I (Figura N° 12 - E).
- Toma de muestra en vial. Línea que conecta el *canister* con metano a un conector con septa de goma donde se puede tomar submuestras de gases con una jeringa (Figura N° 12 - C y D). Esta línea contiene silica gel.

El principio de estas conexiones radica en el uso de enchufes rápidos que empalmen con los conectores machos de los demás elementos. Utilizan el tubo de nylon u otra manguera para conducir el aire de un elemento a otro. Solo debe tenerse precaución de ver si se utilizan medidas de 1/4 o 1/8 de pulgada.

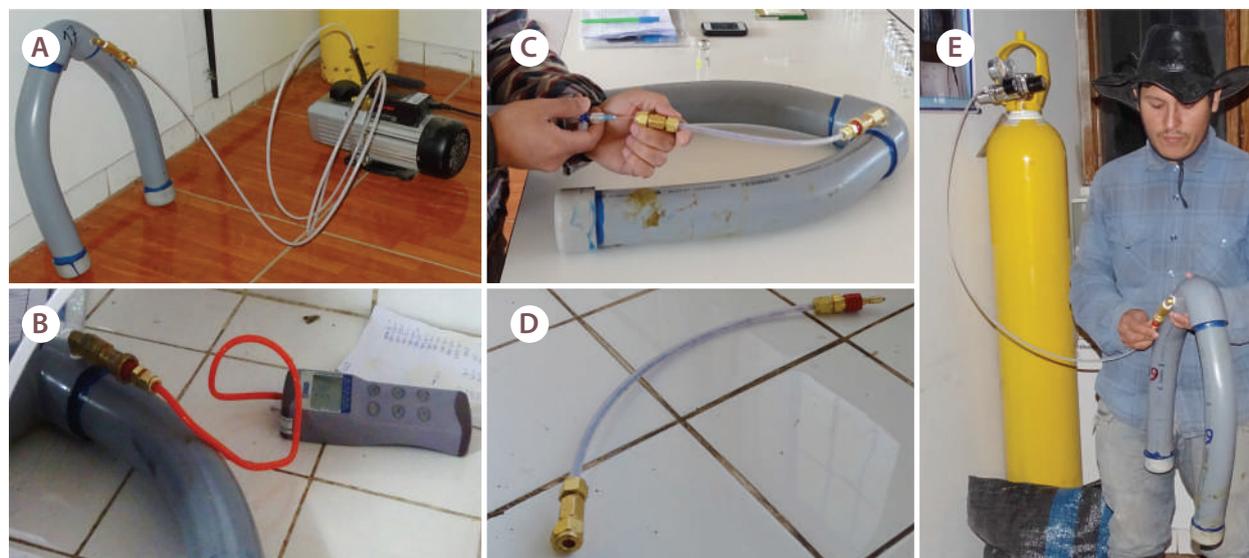


Figura N° 12. Líneas anexas para conexiones.

En el caso de la línea para submuestreo (Figura N° 12 – C y D) se utiliza un tubo de nylon de 1/4" que termina por un lado en un conector macho que se inserta en el *canister* y por otro en una unión recta B-200-6 (Swagelok). En esta última se coloca la septa que será el punto de ingreso de la aguja para el muestreo.

### 3.2.6. Generación de vacío de viales

En las metodologías empleadas, tanto para cuantificar metano de la fermentación ruminal de animales al pastoreo como para cuantificar óxido nitroso proveniente del suelo de pasturas para el ganado, se utilizan viales para recibir las muestras de aire que serán posteriormente leídas en el cromatógrafo. Esta es solo una de varias alternativas para el submuestreo de gases (p. ej., bolsas herméticas y tubos de *vacutainer*).

#### a. Los viales

Los viales son frascos de vidrio donde se almacenan las muestras gaseosas, con capacidad diversa (en nuestro caso de 22 ml). Su uso específico es para cromatografía de gases. Son sellados herméticamente con tapas de aluminio y con septas o *septum* de goma, que se ubican entre la tapa y la boca del vial (Figura N° 13).

La elección del vial adecuado dependerá de los modelos disponibles en los catálogos de las marcas de los *headspace* (o automuestreador, equipo para inyección automática de muestras de gases desde los viales al cromatógrafo de gases) que se utilicen para analizar las muestras, pues el vial debe tener las dimensiones que requiere el *headspace*.

Las septas de goma deben ser del material que se selle con mayor facilidad luego de la introducción de agujas. Deben permitir realizar la mayor cantidad de perforaciones manteniendo por el mayor tiempo posible la muestra. En nuestro caso hemos optado por trabajar con septas de butilo, que vienen pre ensambladas con la tapa de aluminio.

Es recomendable probar las distintas septas disponibles para el vial que se pretende utilizar. Estas pruebas se realizan con un ensayo simple: se vacían varios viales y se agrupan dándoles distinto número de pinchadas a la septa (p. ej. 3, 6, 12), se les hace pruebas de agua (ver sección 3.2.6 - d.) cada cierto tiempo (p. ej., 1 semana, 2 semanas, 1 mes, 2 meses) y visualmente se identifica si el nivel del agua alcanza el cuello del vial. En caso contrario, se están produciendo fugas.

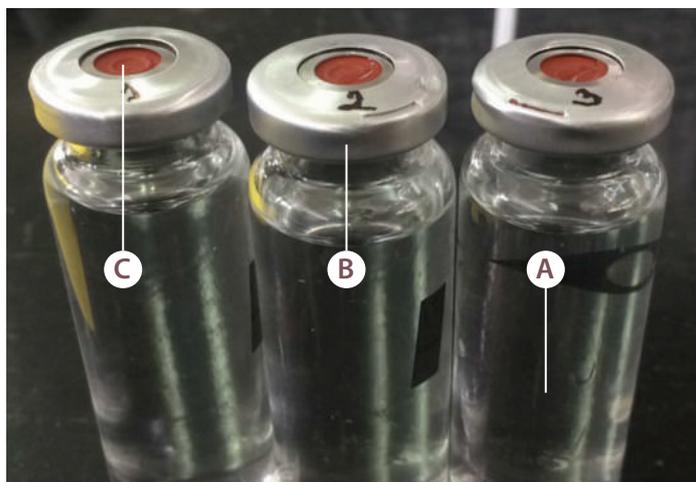


Figura N° 13. Partes de un vial.

A. Vial de vidrio, B. Tapa de aluminio, C. Septa o Septum.

#### b. Línea para vacío de viales

La línea para vacío cumple la función de extraer el aire de los viales, de modo que el espacio vacío lo pueda ocupar exclusivamente la muestra gaseosa, sin contaminación con el aire exterior.

La línea de vacío está compuesta por una tubería que conecta una bomba de vacío con una serie de válvulas para gases. (Nosotros empleamos modelos de 3 a 6 tomas. Lograr una entre mayor cantidad y extensión el vacío tomará más tiempo). Estas válvulas desembocan en agujas de 23G que se insertan en las septas de los viales para la extracción del aire. El sistema cuenta también con una llave de fuga para evitar el sobre esfuerzo de la bomba, cuando se hace un trabajo en grandes cantidades de viales.

Los materiales requeridos para la construcción de esta línea son los siguientes (las cantidades varían en función a la cantidad de salidas del sistema):

- Válvula esférica para gas mariposa 1/2". Considerar siempre una para fuga (Figura N° 15 – 1).
- Tubos de bronce en T 1/2" (Figura N° 15 – 3)
- Tubos niple de bronce 1/2" (Figura N° 15 – 4)
- Codos de bronce 1/2" (Figura N° 15 – 2)
- Acoples hembra de bronce para gases 1/2" (Figura N° 15 – 5)
- Manguera de silicona de 5 mm de diámetro interno (grado médico)
- Llaves de 3 vías (Figura N° 15 – 6)
- Aguja de 23G x 1" (Figura N° 15 – 7)
- Superpegamento (p. ej., Triz)
- Silicona roja RTV Gasket Maker (forma empaques)
- Teflón para gases (Se recomienda marca Swagelok, que provee más seguridad que otras marcas del mercado)
- Soporte universal y nueces para sostener la tubería.

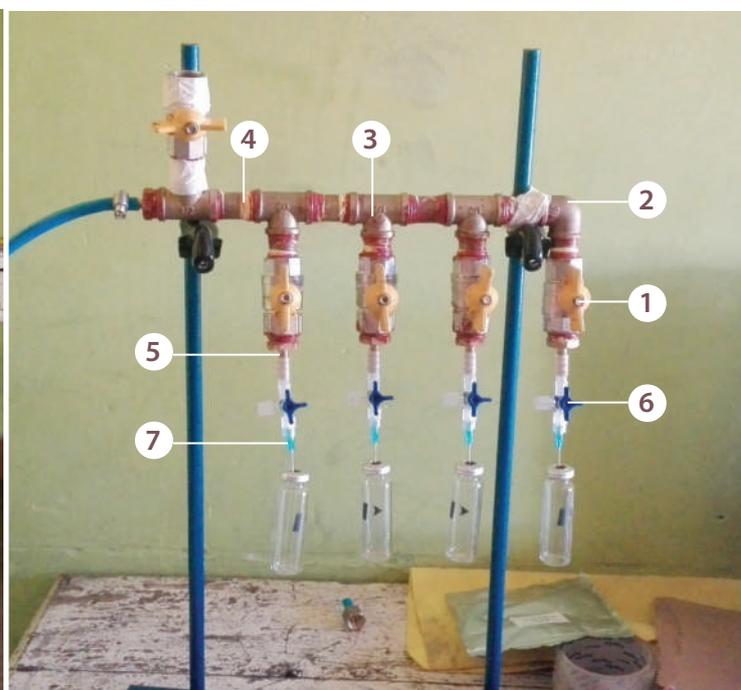
Además, para la operación de la línea de vacío se requiere:

- Bomba de vacío de doble etapa (p. ej. Marca: CPS, modelo VP12D). Se recomienda que cualquier bomba utilizada tenga un vacío final de al menos 10 micrones (1.3 Bar).

las líneas de vacío pueden construirse con tubos de plástico o de metal, siendo las de metal las más seguras. Al proceder con la construcción del sistema, en cada rosca debe darse varias vueltas con el teflón para gases, para asegurar el sellado hermético. La silicona se usa para sellar por fuera las uniones.



**Figura N° 14.** Sistema de vacío de viales. Bomba de vacío conectada a la tubería con válvulas para el vacío de viales.



**Figura N° 15.** Sistema de vacío de viales.

Se recomienda alcanzar una presión de -0.9 bar en el sistema de vacío, y encontrar el tiempo de extracción necesario para que la línea haga un vacío homogéneo y máximo. Para nuestro caso hemos empleado de 3 a 5 minutos de extracción y un sistema de 4 tomas. La forma de probar que el vial alcanza un vacío máximo está en la sección 3.3.3.

### c. Procedimiento de vacío, crimpado y conservación de viales

Los viales por lo general se vacían en un momento próximo al de colección (el mismo día es lo más recomendable), para evitar posibles pérdidas de vacío. Se hacen los controles de calidad, mencionados en la sección 3.4., de forma periódica para evitar llevar a campo lotes de viales que no tengan buen vacío.

El crimpado es el procedimiento de sellado por presión de los viales con el septum de goma y la tapa de aluminio. Este proceso debe garantizar que no se produzcan fugas de gas. Es recomendable que se realice con un crimpador automático, pues el sellado resulta más seguro y uniforme en los viales.

Cada crimpador posee una graduación propia para el ajuste de la tapa. En el experimento realizado en Perú se utilizó un crimpador Perkin Elmer de 20 mm, al que se graduó con una potencia entre 50 a 75 (número de toques al botón del crimpador) y en altura, para garantizar un buen sellado. La graduación ideal es la que logre mantener el vacío después de las pruebas respectivas.

Normalmente se recomienda que no se ejerza tanta presión en el crimpado para que no se deforme la tapa de aluminio de los viales. Sin embargo, en los experimentos de altura ha resultado necesario un ajuste fuerte que sí causa deformación, pero evita que el vacío/muestra se pierda.



**Figura N° 16.** Formas de tapa de aluminio tras diferentes intensidades de crimpado.

*A: tapas lisas, crimpadas sin exceso de presión. B: tapas arrugadas por la alta presión usada.*

Una vez que se tienen los viales preparados, el procedimiento de vaciado es el siguiente:

- Suspender los viales en las agujas del sistema de vacío. Insertarlas aproximadamente 1 cm.
- Dejar abiertas todas las válvulas, incluida la fuga y las llaves de 3 vías.
- Encender la bomba de vacío.
- Cerrar la llave de fuga.
- Iniciar el conteo del cronómetro y esperar 3 minutos.
- Cerrar las llaves de 3 vías, luego las válvulas.
- Sacar rápidamente los viales.

### d. Puntos de control en el vacío de viales

Para asegurar que los viales hayan sido vaciados correctamente se tienen algunos puntos de control:

- Prueba del llenado del vial con agua. Se coloca de cabeza un vial sobre un recipiente con agua y se pincha con una aguja, cuyo conector debe estar sumergido en todo momento en el agua. El vial se llenará de agua si existe vacío, y se

considera un buen nivel de vacío alcanzado cuando el agua sobrepasa el cuello del vial. Siempre existirá un espacio de aire que no se logre llenar. Es recomendable, al momento de vaciar grupos grandes de viales, realizar este control cada 100 viales (por ejemplo), para saber si no hay fallas en el sistema de vacío.

- Ajuste de la tapa y crimpado. Si la tapa de aluminio se desliza fácilmente al tratar de girarla con cierta fuerza, el vial no ha sido sellado correctamente.
- Prueba del nitrógeno. En caso de que se detecte que la instalación del sistema de vacío es la que presenta fugas y no se ha logrado identificar dónde, se recomienda presurizar con  $N_2$  u otro gas el sistema completo, cerrarlo completamente y sumergirlo en agua. Cualquier rajadura o unión que no se haya hecho correctamente empezará a burbujear de inmediato.

### 3.3. Acondicionamiento y colección

#### 3.3.1. Acondicionamiento de espacios

Posteriormente al diseño del experimento, y en simultáneo a la construcción de los elementos de colección de gases, se van preparando las instalaciones donde se ejecutará el experimento. Son importantes los siguientes espacios:

Taller de trabajo. Es el espacio donde se armarán los elementos de colección de gases. Debe contar con mesa de trabajo amplia (para los procesos de corte y doblado de tubos de PVC), un taladro de pedestal y de tornillo de banco, así como energía eléctrica.

Laboratorio de trabajo. Donde puedan realizarse trabajos más finos, como la calibración de cápsulas y capilares, el pesaje de marcadores, el vacío de *canisters* y viales, y la toma de muestras de los *canisters*. Un espacio como este debe existir, y estar disponible, cerca del lugar donde se construyen los elementos de colección. También cerca de los experimentos de campo (para el caso de experimentos que se ejecutan a distancia del centro de operaciones).

Campo experimental. La condición es el cercado apropiado, ya sea con cerca permanente o móvil, considerando la carga animal y tiempo de pastoreo, así como la permanencia o separación de los animales del experimento del resto del hato. Esto dependerá de las posibilidades logísticas para lograr un manejo separado, y de la adaptación de los animales del hato con los animales del experimento.

Brete de manejo. Necesario para la colocación de las cápsulas de permeación y el cambio diario de *canisters*, de lo contrario el trabajo se hace más difícil y lento. No es necesario construirlo siempre. Por ejemplo, si se dispone de sala de ordeño, los casilleros de ordeño pueden usarse como bretes.

#### 3.3.2. Acondicionamiento de animales

Existen cuatro procesos que deben tenerse en cuenta:

**Inserción de la cápsula de permeación** (Figura N° 17). Las cápsulas calibradas y numeradas se insertan en los animales experimentales por medio de una sonda orofaríngea o un lanzabolos de 16" a 18.5", siete días antes del inicio del experimento. Los animales deben permanecer en observación por al menos 2 horas posteriores, y se debe revisar su ambiente al día siguiente para tener seguridad de que no hayan regurgitado la cápsula. Se debe registrar en una planilla el número de cápsula de permeación insertadas en cada animal.



Figura N° 17. Inserción de cápsulas de permeación en vacunos.



Figura N° 18. Acondicionamiento con jaquima y manguera temporal.

**Acostumbramiento al equipo de colección de gases.** Puede durar 3 o más semanas, en las que los animales se acostumbren al uso de los *canisters*, de modo que se reduzca la posibilidad de que intenten quitárselos. Por ello se recomienda que se acostumbren 3 semanas con la jáquima y cargando una manguera flexible de 2", *canisters* fallidos o cadenas recubiertas con manguera, para que tomen costumbre de cargar un elemento en el cuello (1.5 a 3 semanas antes del inicio del experimento). Es recomendable cambiar diariamente estos dispositivos durante el ordeño, para adecuarlos al manejo. También es importante que esto lo hagan junto al resto del hato, así los otros animales también se acostumbran a verlos con esos elementos puestos y pierden la curiosidad (que podría llevarlos a morderlos o golpearlos).

**Acondicionamiento al marcador.** Cuando se ejecutan evaluaciones de consumo de alimento y se emplean marcadores como el óxido crómico o el dióxido de titanio, existe un periodo de 6 días antes de la primera colecta de heces (200 gr/día y conservada a -20°C) en que se inicia la dosificación de marcador (dióxido de titanio: 10 gr/día en ensayo de Colombia y 25 gr/día en ensayo de Perú). Es más recomendable que dicha dosificación se reparta en 2 momentos del día y que se asegure el consumo total del marcador. Si el marcador es poco palatable, hay varias formas de administrarlo: puede darse agregado en la parte media del alimento concentrado durante el ordeño, en paquetitos de papel crepé remojados en glicerina o usando cápsulas de gelatina.

**Acondicionamiento a la dieta.** Cuando se realizan experimentos con dietas diferentes a las que el animal consume regularmente (para evitar efectos de los cambios de dieta sobre la flora ruminal, que pueden afectar las emisiones de metano), se prefiere administrar la nueva dieta 20 días antes del inicio de la toma de muestras, y en forma gradual. Si hay cambios sucesivos de dietas, se termina la colección de muestras bajo una dieta y nuevamente se pasa por un periodo de adaptación de 20 días para la siguiente colección.

### 3.3.3. Procedimiento de colección de gases

El procedimiento de colección implica vacío de viales, vacío de *canister*, colocación de *canister* y líneas, colección de metano en *canister*, presurización de *canister* y toma de muestras en viales.

- a. **Colocación de los *canisters*.** Se inmoviliza (en un brete de manejo o en la sala de ordeño) a los animales ya acostumbrados y que tienen jáquimas puestas. Se registra la presión de vacío con la que ingresan los *canisters* que serán colocados. Para condiciones de Perú, a 3200 m.s.n.m. se trabaja con una presión de -675 mbares y a 4100 m.s.n.m. con -600 mbares; en Colombia, a 2560 m.s.n.m. se trabaja con -710 mbar. Una vez registrada esta medida se les colocan los *canisters* en el cuello. El collar se sujeta a la jáquima con rafia (Figura N° 19) o con velcros pegados a los tubos y cosidos a la jáquima, de modo que no haya posibilidad de que el collar gire.



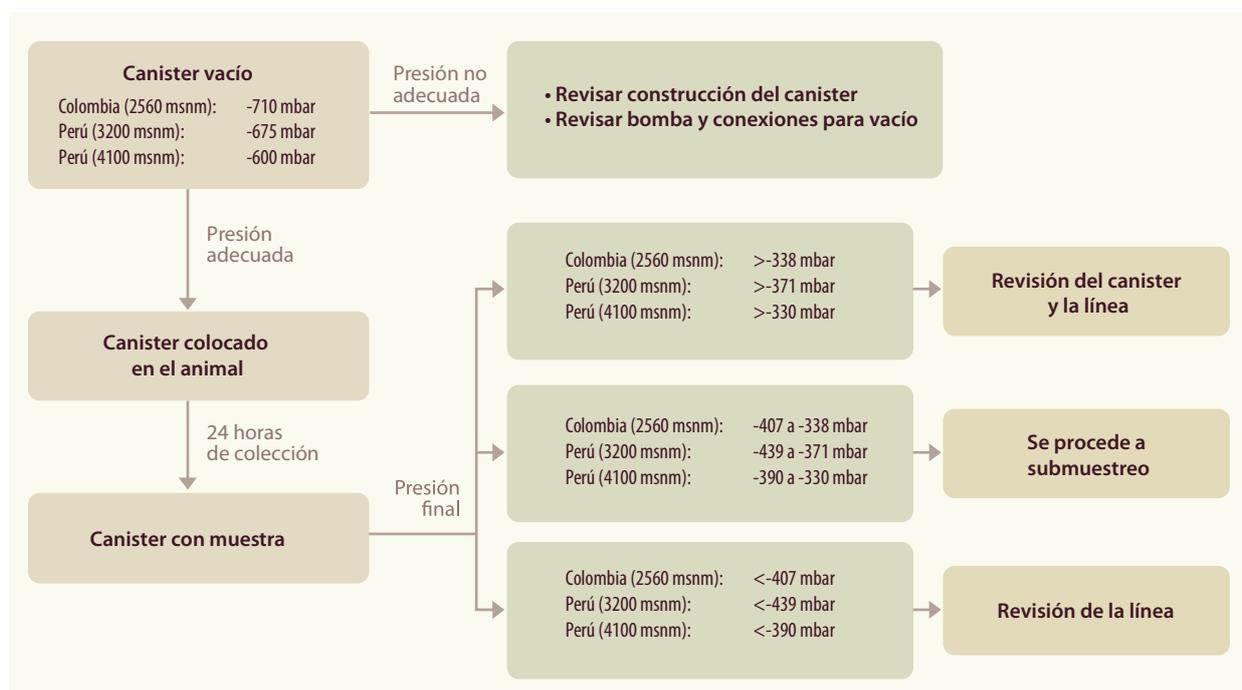
Figura N° 19. Colocación y ajuste de *canister* y línea de muestreo en el animal.

- b. **Colocación de la línea de muestreo.** La línea de muestreo se conecta desde el *canister* hasta la nariz del animal. La longitud del tubo de nylon no debe ser muy grande, pues puede conducir a tomar muestras poco representativas; ni muy pequeña, pues podría estirarse y romper por el movimiento del animal. Es recomendable forrar con *duck tape* el tubo de nylon que compone la línea, como un refuerzo para evitar rupturas o dobleces. La línea se fija con cintillos a distintos puntos en la jácquima; y sobretodo el filtro, en la parte de cuero sobre los ollares.



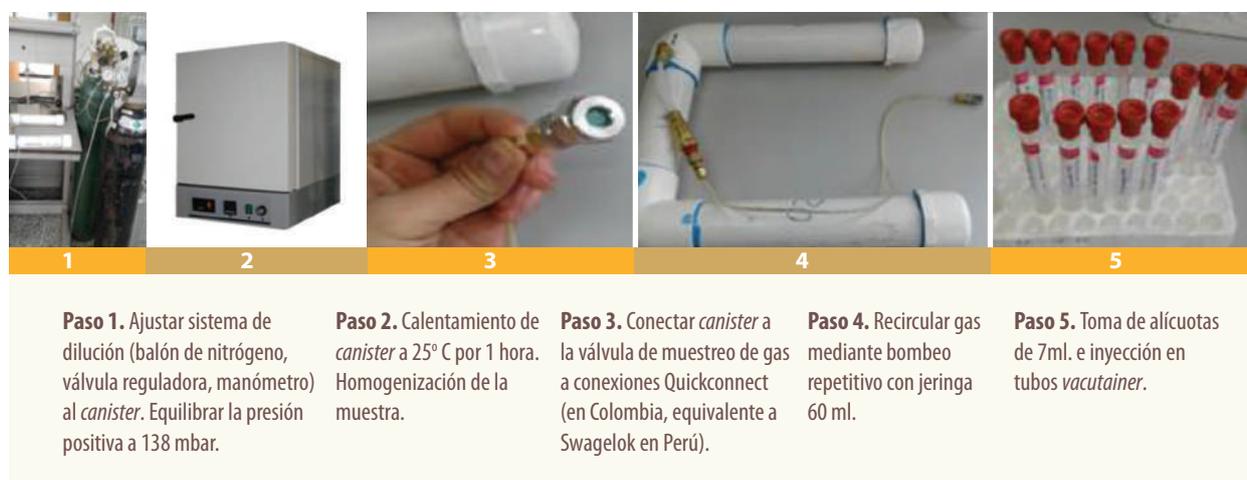
**Figura N° 20.** Detalle de ajuste de línea de muestreo con cintillos a nivel de ollares.

- c. **Ubicación del blanco.** En la misma zona donde pastorean los animales se debe tomar una muestra “blanco”, o de aire ambiental. Esta se toma en un *canister* que se coloca sobre algún poste a la misma altura que estaría si estuviera colocado en una vaca, y por el mismo tiempo que las vacas tienen colocados los suyos. Se debe evitar ubicar este *canister* en lugares cercanos a torres de alta tensión u otros que emiten SF<sub>6</sub> y pueden enmascarar las emisiones reales de este gas del ambiente natural. Sin embargo, una opción más efectiva, si se dispone de animales, es la utilización de blancos móviles colocados en animales que no han sido dosificados con cápsulas de SF<sub>6</sub>, con los *inlets* de la línea de muestreo posicionados a la altura del costillar.
- d. **Recojo de canister.** Una vez transcurridas las 24 horas de permanencia de los *canisters* en los animales, y capturada toda la emisión de gases durante sus actividades diarias, se procede a recogerlos para llevarlos a laboratorio. Es recomendable realizar este recojo en los momentos de ordeño, cuando los animales son más manipulables y están en instalaciones que facilitan su manejo.
- e. **Controles de calidad en la colección de gases.** Al recoger cada uno de los *canisters* se comprueba con un manómetro su presión final. Se espera que la presión haya aumentado, según lo dispuesto por el investigador, entre un 35% y 45% respecto a la presión de vacío inicial (ensayos en Perú), o entre 43% y 53% (ensayos en Colombia). Si consideramos que el *canister* debe llevarse el vacío en un 40%, al tener una presión de vacío inicial de -675 mbares, se esperaría una presión final se de alrededor -405 mbares. Si la presión aumenta por sobre el llenado esperado (p. ej. -350 mbares), el equipo tiene fugas en algún punto; y si la presión está muy por debajo de lo esperado (ej. -450 mbares) es posible que haya habido una obstrucción en la línea que ha impedido el llenado del *canister* en la tasa deseada. En ambos casos se retira la jácquima con la línea completa (para revisión) y no se considera la muestra. Las líneas pueden recuperarse desarmándolas y limpiándolas con aire comprimido, asegurando las tasas de paso de aire y que no presenten daño físico.



**Figura N° 21.** Proceso de control de presiones en los *canisters* durante la colección de metano de los animales experimentales.

- f. Presurización de *canister*. Después de recolectados los *canisters*, estos son presurizados con nitrógeno (N<sub>2</sub>) UHP (Perú). o UAP grado 5 a flujo lento de 5.75 ml/min (Colombia) hasta que alcancen una presión positiva de 340 mbares o 300 mbares para Perú (3200 msnm y 4100 msnm), y 138 mbar para Colombia (2650 m.s.n.m.). Esta presión se comprueba conectando los *canisters* al manómetro. La presurización (en este caso sobrepresión) es necesaria para facilitar el muestreo en viales y evitar el ingreso o combinación con aire exterior.
- g. Homogenización. Una vez presurizado, el *canister* permanece en reposo por un periodo de 3 horas para homogenizar y estabilizar el aire capturado con el nitrógeno (ensayos Perú), o por una hora en estufa a 25°C (ensayo Colombia).
- h. Extracción de muestra de aire en viales o *vacutainer*. Se conecta la línea de extracción del *canister*, la cual se purga 2 veces antes de extraer la muestra que irá al vial. Para esta operación se emplea la llave de 3 vías, se introduce la aguja de una jeringa de 60 ml en la septa y la sobrepresión del *canister* empujará el émbolo. Al llenarse se gira la llave para que fugue de la jeringa al exterior, luego se deja abierto el canal de la conexión a la jeringa y se repite la purga. En la tercera oportunidad se toma la muestra, en viales (22 ml) o en *vacutainer* (7 ml), con o sin sobrepresión (por ejemplo, en un vial de 22 ml se coloca 50 ml de muestra). En lugar de realizar la purga puede ejecutarse un bombeo repetitivo con la jeringa. Opcionalmente, luego de tomar una muestra puede purgarse la línea de extracción con N<sub>2</sub>, para evitar que queden residuales de SF<sub>6</sub> en ella; sin embargo, este proceso hace que el muestreo en viales tome mayor tiempo. Al finalizar, el *canister* se limpia saturándolo con nitrógeno UHP o UAP hasta alcanzar la presión aproximada de 580 mbar. Se repite la limpieza 3 veces, y se hace vacío.



**Figura N° 22.** Proceso de presurización y extracción de muestras de gases contenidos en el *canister*.

En el proceso se hacen 3 tomas importantes de presión. Una al vaciar el *canister* (P<sub>i</sub>), luego de la colección de metano en el animal por 24 horas (P<sub>i</sub>) y al presurizar con nitrógeno (P<sub>N</sub>). Estas presiones sirven para el control de calidad del proceso de colección y para hacer los cálculos del factor de dilución.

# 4

## Colección de muestra de gases para determinación de óxido nitroso

### 4.1. Metodología de cámara estática

El método de la “cámara estática” permite capturar las emisiones de gases que se producen desde el suelo, mediante recipientes herméticamente sellados (cámaras) insertados en el suelo. En el caso del óxido nitroso, el gas proviene fundamentalmente de las reacciones mediadas por microorganismos en el suelo y bajo tres mecanismos (Dalal *et al.* 2003): nitrificación (usando nitritos como aceptores de electrones), desnitrificación por reducción desasimilatoria de nitratos y desnitrificación por reducción asimilatoria de nitratos. Actualmente estamos empleando para el desarrollo del proceso de colección los principios de la guía metodológica de Klein y Harvey (2015), publicada por el Ministerio de Industrias Primarias de Nueva Zelanda, con la contribución de los científicos pertenecientes a la Global Research Alliance.

La metodología consiste en la colocación de cámaras de PVC, enterradas en los suelos donde crecen las pasturas o pastizales donde se alimenta el ganado. Las cámaras poseen una tapa que permite un sellado hermético; es decir que todo el gas que salga, como producto de las reacciones químicas del suelo, quedará atrapado al interior de la cámara. Esta cámara posee una fuga regulable donde se toman muestras del gas acumulado: se conduce una fracción de ese gas a viales de vidrio, por un mecanismo de succión simple (con una jeringa). Las cámaras se sellan solamente los días determinados para el muestreo, que varían según la naturaleza del experimento, y durante el tiempo que dura el proceso de colección. Este proceso comprende la extracción de muestras a los 0, 20 y 40 minutos de selladas las cámaras, en algunos casos incluso hasta los 60 minutos. Es decir, la cámara acumula el gas generado en 40 minutos o una hora, y se extraen pequeñas muestras en las que se analiza el incremento de la concentración del óxido nitroso conforme avanza el tiempo a partir del sellado de la cámara. Cuando se obtienen las concentraciones (por cromatografía de gases), estas se utilizan para calcular cuánto óxido nitroso ha sido liberado por determinado plazo de tiempo y por área de suelo (el área de la cámara).

### 4.2. Construcción de cámaras

Existe gran variedad de diseños de cámaras en la literatura especializada, pues son adaptadas para las condiciones de los cultivos que se pretende evaluar y también al material que se dispone localmente. Lo fundamental es que las cámaras posean un sellado hermético y que no contengan materiales que contaminen la muestra gaseosa. Fuera de ello se puede emplear cualquier diseño, respetando ciertas dimensiones y proporciones.

Existen algunas recomendaciones principales para el dimensionamiento de la cámara (Klein *et al.*, 2015):

1. La relación área/perímetro de la cámara debe ser superior a 10. Lo que implicaría utilizar cámaras un diámetro mínimo de 40 cm.
2. La relación de la altura de cámara/tiempo de evaluación debe ser superior a 40 cm/h.

Sin embargo, en lo práctico las válvulas no siempre resultan ser adecuadas, por lo que no se trata de reglas absolutas. No son recomendadas para reducir errores, que pueden ser compensados, por ejemplo, usando un mayor número de cámaras o haciendo un mayor número de mediciones.

#### Materiales:

- Tubo de PVC para desagüe de 25 cm diámetro interno (Figura N° 18 – A)
- Tapas acrílicas (nylon) (Figura N° 18 – B)
- Terminal macho manguera 3/16"ID x 1/8" NPTM. Marca: Swagelok. Código: B-3-HC-1-2 (Figura N° 18 – C)
- Silicona roja RTV Gasket Maker (forma empaques) (Figura N° 18 – D)
- Cerrojos tipo clip (Figura N° 18 – E)
- Llave de 3 vías (Figura N° 18 – F)
- Agujas de 23G x 1" (Figura N° 18 – G)
- Manguera de silicona de 5 mm diámetro interno (grado médico) (Figura N° 18 – H)

Las cámaras que empleamos tenían 35 cm de largo y 25 cm de diámetro, con un grosor del tubo de 6 mm. Las tapas se mandaron a preparar en acrílico, por un tornero, haciéndolas más amplias que el diámetro del tubo y con una canaleta para el encaje del borde del tubo (Figura N° 18 – D). Además, la parte del tubo que encaja con la tapa fue rebajada para que tenga un anclaje perfecto (Figura N° 18 – I). En el borde de la tapa se aplicó la silicona roja, a manera de empaquetadura, para que permita el sellado hermético, por presión del tubo al cuerpo de la cámara (Figura N° 18 – D). Dicha presión se logró con los “ganchos” de aluminio instalados en tres puntos fuera del tubo, que ajustaban la tapa al cuerpo de la cámara, anclándose a unas hendiduras en la tapa (Figura N° 18 – J).



**Figura N° 23.** Elementos de la cámara estática para la colección de muestras de óxido nítrico.

### 4.3. Acondicionamiento y colección

#### 4.3.1. Acondicionamiento del sitio experimental

Al desarrollar un experimento de medición de óxido nítrico resulta necesario encontrar un lugar representativo de la vegetación que se quiere evaluar, y también que en ese espacio la vegetación se encuentre uniformemente distribuida, con la menor presencia de factores que puedan afectar la emisión entre uno y otro punto, como parches de vegetación, cárcavas, fuentes de agua, entre otros. Es necesario cercar los espacios de medición de modo que se pueda controlar el ingreso de animales para que no perturben el desarrollo de la medición ni las cámaras de colección de óxido nítrico.

En el caso del experimento realizado en Junín (Perú) a 4100 m. s. n. m., se trabajó con dos áreas de 20 x 16 m, que albergaron 16 cámaras cada una. Se dejaron calles de 2 metros y un borde de 3 metros alrededor de las parcelas en las que se distribuyeron las cámaras.

#### Consideraciones para la instalación de cámaras

Las cámaras se instalan en parcelas de 2 x 1 m (Figura N° 19). Esta subparcela se divide en dos partes de 1 m<sup>2</sup>. En la primera parte se ubica la cámara y en la segunda se toman las muestras de suelo.

Todo tratamiento que se aplique en la cámara debe aplicarse en la otra subparcela, donde se tomarán las muestras de suelo.

En terrenos blandos o sueltos, la cámara puede enterrarse colocándola sobre el suelo, parándose sobre ella y hundiéndola a medida que se empuja la tierra con una lampa pegada a los bordes de la cámara. En el caso de terrenos pedregosos o duros, se sugiere regar el día anterior a la instalación de las cámaras.

Una vez enterrada la cámara, debe medirse su altura desde el suelo, en cuatro puntos de la cámara (Figura N° 22 – F), de modo que pueda obtenerse el volumen real de la cámara que servirá para los cálculos de emisión.

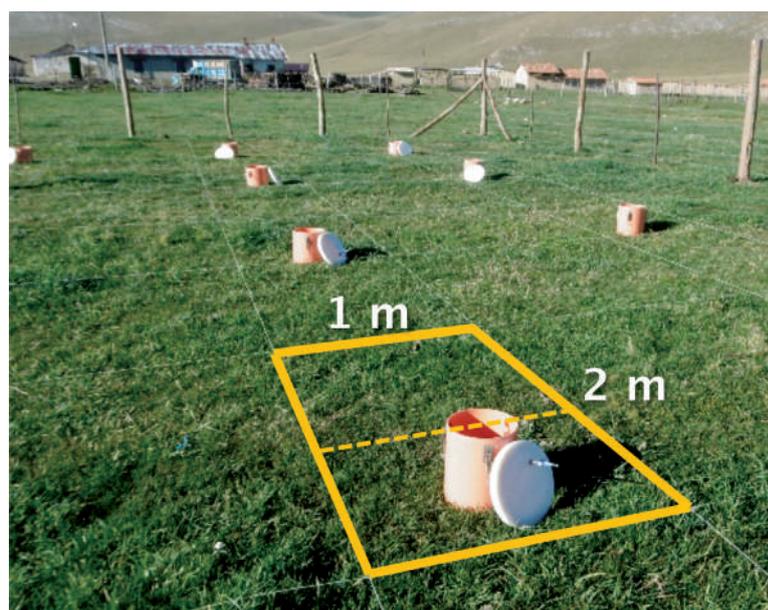


Figura N° 24. Ubicación de cámaras estáticas en subparcelas.



Figura N° 25. Instalación de cámaras estáticas.

#### 4.3.2. Procedimiento de colección de gases

##### Establecimiento de momento de muestreo

Las mediciones para determinar el flujo diario de emisión de óxido nítrico se toman en un solo momento del día. Sin embargo, a lo largo de 24 horas las emisiones fluctúan considerablemente. Por ello resulta necesario determinar la hora del día en la que se produce la emisión promedio, para establecerla como el momento de muestreo. Esto se lleva a cabo tomando medidas de las emisiones en varios momentos del día, en periodos espaciados por 2 horas, por ejemplo. Se promedian las emisiones obtenidas y se escoge como momento de muestreo la hora del día que tenga la emisión que se acerque más al promedio obtenido. En el caso de los experimentos realizados en el proyecto, se utilizó la temperatura del suelo durante el día como indicador de la dinámica de las emisiones; sin embargo, la cuantificación de flujos es la forma más precisa.

## Proceso de colección de muestras de gases

- Al igual que en el caso de metano, se utilizan viales como contenedores finales de las muestras de gas. La preparación del vacío es idéntica a la que se muestra en la sección 3.2.6.
- Tener dispuestos los materiales en el campo experimental. Colocar todas las tapas al lado de sus cámaras, con las jeringas respectivas.
- Tener preparados los materiales que se llevan durante el recorrido:
  - Una caja de herramientas que contenga material de reemplazo: agujas, jeringas, silicona, viales.
  - Las gradillas con los viales estarán debidamente codificadas (por ejemplo, #cámara – tiempo – día de colección: 14 – 20 – 3) y ordenadas de acuerdo a la disposición de las cámaras en campo que se utilizarán en ese tiempo de muestreo. Es recomendable tener espacio en la gradilla para ir separando los viales con muestra de los que están por coleccionar. Manteniendo este orden se puede trabajar rápidamente, evitando confusiones.
  - Un cronómetro para poder cambiar de cámara en el tiempo exacto. Lo usual es que tome un minuto muestrear la cámara. La idea es que en una ronda no se exceda el tiempo de los 20 minutos, que es cuando ya se tiene que tomar la siguiente muestra.
- Antes de iniciar la colección es importante que todas las llaves de 3 vías estén abiertas y las jeringas sin aire en lo absoluto.
- El proceso de colección de óxido nitroso consta de 3 momentos de muestreo en viales: al tiempo 0, a los 20 minutos y a los 40 minutos, desde que se tapa la cámara.
- La colección se inicia haciendo correr el cronómetro en la primera cámara. Se procede a tapanla y se introduce la aguja que sale de la tapa de la cámara en el vial, al igual que la aguja de la jeringa. Es decir, el vial debe tener ambas agujas introducidas.
- Se bombea con la jeringa 3 veces el aire, y en la tercera ocasión se dejan llenos los 50 ml del volumen de la jeringa (Figura N° 22). Se cierra la llave de 3 vías de la cámara y se retira con rapidez el vial de la aguja de la cámara, pero sin retirar la aguja de la jeringa del vial.
- Se inyecta el volumen completo al vial, presionando al máximo el émbolo de la jeringa. Se sugiere hacerlo hasta que se note que émbolo de la jeringa está fuertemente presionado al tubo de la jeringa; de ser necesario uno puede empujar el embolo apoyándolo en la rodilla u otra superficie dura. Se cierra la llave de 3 vías de la jeringa y/o se retira con rapidez la jeringa.
- Se deja la jeringa sobre la tapa de la cámara y el vial se coloca, manteniendo el orden, al lado de la gradilla destinada para viales con muestra.
- El proceso de muestreo de una cámara debe durar un minuto o el tiempo dispuesto. En caso de que cumpla el tiempo y no se haya terminado de muestrear, es mejor perder esa muestra y pasar a la siguiente cámara.
- Una vez que se coleccionan muestras de todas las cámaras para el tiempo 0, se espera que el cronómetro llegue a los 20 minutos y se procede a muestrear nuevamente todas las cámaras en mismo orden. Estas son las muestras del tiempo 20. Igual que en el caso anterior, se espera a llegar a los 40 minutos para iniciar el siguiente muestreo.
- En el último periodo pueden destaparse las cámaras una vez que se finaliza de tomar la muestra de cada cámara. Es importante dejar las tapas y jeringas al costado para facilitar el recojo, también tapar las agujas (por seguridad).



**Figura N° 26.** Toma de muestras de óxido nitroso en viales, procedente del gas recolectado en la cámara estática.

### Consideraciones para levantamiento de información complementaria

- Existen medidas complementarias a la recolección de muestras de gases que sirven para analizar y discutir los resultados. Estas medidas son las siguientes: humedad de suelo, densidad de suelo, temperatura de suelo, espacios porosos llenos de agua (WFPS %), concentración de nitratos y amonio, y las características físicas del suelo.
- La temperatura de suelo se toma al inicio y final de la colección. Se deja un termómetro cerca del centro del campo experimental, enterrando la misma longitud a la que está enterrada la cámara.
- La temperatura de cámara se toma con un termo-higrómetro con sensor externo (Figura N° 22 – E), ubicando el sensor de modo que no choque con ningún elemento dentro de la cámara. Cada día de colección, se toma esta medida en una sola cámara al azar, al colocar el sensor y luego al final de la colección.
- La humedad de suelo, densidad de suelo y contenido de amonio y nitratos se obtienen con un muestreador de suelo (Figura N° 28 – A y B), al finalizar los muestreos de aire y en cada una de las subparcelas para toma de muestras contiguas a las cámaras. El muestreador debe enterrarse a la misma profundidad que las cámaras y debe conocerse su volumen (para determinar la densidad).
- La caracterización de las propiedades físico – químicas del suelo se hace una sola vez en un año, tomando una muestra compuesta de 4 puntos de la parcela experimental.
- Es necesario monitorear la precipitación, de preferencia con un pluviómetro instalado en el sitio experimental (Figura N° 22 – C y D), como elemento de discusión para justificar picos de emisiones.



**Figura N° 27.** Toma de información complementaria para la interpretación de resultados y los cálculos de flujo de emisión de óxido nítrico.

# 5 Bibliografía

---

**Berndt, A., Boland, T. M., Deighton, M. H., Gere, J. I., Grainger, C., Hegarty, R. S., Iwaasa, A. D., Koolaard, J. P., Lassey, K. R., Luo, D., Martin, R. J., Martin, C., Moate, P. J., Molano, G., Pinares-Patiño, C., Ribaux, B. E., Swainson, N. M., Waghorn, G. C., Williams, S. R. O. 2014.** Guidelines for use of sulphur hexafluoride (SF<sub>6</sub>) tracer technique to measure enteric methane emissions from ruminants. Pages 166. M. G. Lambert, ed. New Zealand Agricultural Greenhouse Gas Research Centre, New Zealand.

**Dalal, R. C., Wang, W., Robertson, G. P., Parton, W. J. 2003.** Nitrous oxide emission from Australian agricultural lands and mitigation options: a review. *Australian Journal of Soil Research* 41: 165 – 195.

**Grainger, C., Williams, R., Clarke, T., Wright, A. - G., & Eckard, R. J. 2010.** Supplementation with whole cottonseed causes long-term reduction of methane emissions from lactating dairy cows offered a forage and cereal grain diet. *Journal of Dairy Science* 93 (6), 2612-2619. DOI: 10.3168/jds.2009-2888

**IDEAM, PNUD, MADS, DNP, CANCELLERÍA. 2016.** Inventario nacional y departamental de Gases Efecto Invernadero – Colombia. Tercera Comunicación Nacional de Cambio Climático. IDEAM, PNUD, MADS, DNP, CANCELLERÍA, FMAM. Bogotá D.C., Colombia.

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

**Johnson, K. A., Westberg, H., Michal, J., Cossalman, M. 2007.** The SF<sub>6</sub> tracer technique: methane measurement from ruminants. In: *Measuring Methane Production from Ruminants*.

**Klein, C. A. M. y M. J. Harvey (2015).** Nitrous Oxide Chamber Methodology Guidelines. Nueva Zelanda: Ministry for Primary Industries.

**Lassey, K., Ulyatt, M., Martin, R., Walker, C., Shelton, I. 1997.** Methane emissions measured directly from grazing livestock in New Zealand. *Atmospheric environment* 31 (18), 2905-2914.

**Lassey, K.R., Walker, C.F., McMillan, A.M.S., Ulyatt, M.J, 2001.** On the performance of SF<sub>6</sub> permeation tubes used in determining methane emission rates from grazing livestock. *Chemosphere: Global Change Sci.* 3, 367-376.

**MINAM. 2012.** Inventario Nacional de Gases de Efecto Invernadero (INGEI). Disponible en: <http://infocarbono.minam.gob.pe/wp-content/uploads/2016/03/2012.pdf>

**Montenegro, J., Barrantes, E., DiLorenzo, N. 2016.** Methane emissions by beef cattle consuming hay of varying quality in the dry forest ecosystem of Costa Rica. *Livestock Science* 193, 45-50.

**Woodward S, Waghorn G, Laboyrie P. 2004.** Condensed tannins in birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus*) reduce methane emissions from dairy cows. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production.* 64: 160-164.

FINANCIADO POR:



Ministry for Primary Industries  
Manatū Ahu Matua



Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura

Sede Central. Apartado postal 55-2200  
San José, Vázquez de Coronado, San Isidro 11101 - Costa Rica  
Tel.: (+506) 2216 0222 / Fax: (+506) 2216 0233  
[iicahq@iica.int](mailto:iicahq@iica.int)  
[www.iica.int](http://www.iica.int)



Descarga la versión electrónica