



Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria
U R U G U A Y



Protocolo para Determinación de Emisión de Metano en Rumiantes:

*«Técnica del Trazador SF₆ para
Períodos de Medición Prolongados»*

Diciembre 2022

2^a ed., revisada y ampliada

Protocolo para Determinación de Emisión de Metano en Rumiantes: *“Técnica de Trazador SF₆ para Períodos de Medición Prolongados”*

GRUPO DE INVESTIGACIÓN EN SUSTENTABILIDAD AMBIENTAL INIA-LA ESTANZUELA

Ing. Agr. (PhD) Verónica Ciganda; Lic. Biol. Claudia Simón; Asistente Julieta Mariotta

Area Recursos Naturales, Producción y Ambiente. INIA La Estanzuela

Diciembre 2022

2ª ed., revisada y ampliada

Protocolo para Determinación de Emisión de Metano en Rumiantes:
“Técnica de Trazador SF₆ para Periodos de Medición Prolongados”

© 2022, INIA

e-ISBN: 978-9974-38-480-4

Editado por la Unidad de Comunicación y Transferencia de Tecnología del INIA
Avda. Italia 6201, Edificio Los Guayabos, Parque Tecnológico del LATU, Montevideo,
Uruguay.
<http://www.inia.uy>

Quedan reservados todos los derechos de la presente edición. Este libro no se podrá reproducir total o parcialmente sin expreso consentimiento del INIA.

Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria

Integración de la Junta Directiva

Ing. Agr. José Bonica - Presidente

Ing. Agr. Walter Baethgen - Vicepresidente



Ministerio
**de Ganadería,
Agricultura y Pesca**

Ing. Agr. Martín Gortari

Ing. Agr. Rafael Normey



Ing. Agr. Alberto Bozzo

Ing. Agr. Alejandro Henry



Protocolo para Determinación de Emisión de Metano en Rumiantes: “Técnica de Trazador SF₆ para Períodos de Medición Prolongados”

1. Descripción general de la Técnica SF₆

Existen diversas técnicas para la medición de las emisiones de metano (CH₄) entérico en rumiantes. Entre ellas se destacan las cámaras respiratorias (Pinares-Patiño et al 2011, Storm et al 2012), los sensores instalados en comederos individuales (i.e. “Greenfeed”, Hammond et al 2016), y la técnica basada en la utilización del gas trazador hexafluoruro de azufre (SF₆), originalmente desarrollada por Johnson y Johnson (1995). Esta última técnica permite la cuantificación diaria de CH₄ por animal y es internacionalmente reconocida como muy apropiada para medir las emisiones de metano en sistemas de pastoreo en virtud que los equipos se instalan sobre el animal sin impedir ni limitar sus movimientos ni sus hábitos en la pastura (Johnson et al., 2007; Lassey et al., 1997; Woodward et al., 2004; Grainger et al, 2007). La utilización del SF₆ responde a que es un gas considerado como el mejor trazador para medir la cantidad de metano emitido por los rumiantes, debido a que posee una elevada estabilidad en el rumen de los animales, inclusive superior a la de gases isótopos del metano. En 2012, Gere et al. desarrollaron y publicaron una adaptación de esta técnica que permite diseñar experimentos con animales en pastoreo en tiempos prolongados de muestreo (1, 5, 10 días ó más). En este protocolo se presentan en detalle los materiales necesarios y el procedimiento a seguir que permitirá cuantificar las emisiones de CH₄ entérico en rumiantes según la mencionada adaptación de la técnica original basada en la utilización de SF₆. Se incluyen, además, las ecuaciones que permiten calcular la emisión diaria de CH₄ de cada animal.

2. Materiales necesarios para cada animal

2.1. Para experimentos con tubos colectores a cada lado de la cabeza:

- o Un (1) metro de caño plástico corrugado (similar al utilizado en lavarropas).
- o Un (1) arnés con hebillas para ajuste en el cuello y en la boca del animal. según tamaño de c/animal (Figura 1).
- o Dos (2) porta tubos, de tela resistente reforzadas en la parte inferior. (Figura 2).
- o Dos (2) tubos colectores de 500 mL: cilindros colectores de acero inoxidable cerrados herméticamente, con bases plana. Cada tubo colector debe disponer de un orificio con rosca ¼” (para conexión de acople hembra). Para esto se sugieren dos alternativas:
 - a. Orificio rosca ¼” en la base superior del cilindro (Figura 2a).
 - b. Unión en “L” en el lateral superior del cilindro con rosca ¼” en el extremo inferior del codo (Figura 2b)
- o Dos (2) acople rápido hembra Swagelok Código B-QC4-B-4PM. (Figura 3)

- o Dos (2) acople rápido macho Swagelok Código B-QC4-S 400. (Figura 3)
- o Dos (2) restrictores de flujo. (Figura 4).
- o Dos (2) segmentos de 8 cm aprox. de caño plástico para protección de restrictores. (Figura 1)
- o Un (1) soporte de cuero para restrictores de flujo. (Figura 1)
- o Tela plástica impermeable al agua, pero permeable al aire para protección del restrictor y cierre del caño protector (Figura 1).
- o Dos (2) segmentos de manguera de PVC TPU 6*1 10 bar, 1/4 .
- o 1 tubo de permeación (o cápsula) relleno de gas SF₆ (Figura 5).
- o 1 lanza-bolos manual (Figura 5).
- o Precintos plásticos (también llamados sunchos) descartables (Figura 1). Medidas 4.30 x 9 mm, 4.8 x 300 mm y 2.5 x 150 mm.

2. 2. Para experimentos con tubos colectores sobre el lomo:

- o Un (1) arnés con hebillas para ajuste en el cuello y en la boca del animal. según tamaño de c/animal (Figura 1).
- o Dos (2) tubos colectores de 500 mL: cilindros colectores de acero inoxidable cerrados herméticamente, con bases plana. Cada tubo colector debe disponer de un orificio con rosca 1/4" (para conexión de acople hembra). Para esto se sugieren dos alternativas:
 - c. Orificio rosca 1/4" en la base superior del cilindro (Figura 2a).
 - d. Unión en "L" en el lateral superior del cilindro con rosca 1/4" en el extremo inferior del codo (Figura 2b)
- o Dos (2) acople rápido hembra Swagelok Código B-QC4-B-4PM. (Figura 3)
- o Dos (2) acople rápido macho Swagelok Código B-QC4-S 400. (Figura 3)
- o Dos (2) restrictores de flujo. (Figura 4).
- o Dos (2) segmentos de 8 cm aprox. de caño plástico para protección de restrictores. (Figura 1)
- o Un (1) soporte de cuero para restrictores de flujo. (Figura 1)
- o Tela plástica impermeable al agua, pero permeable al aire para protección del restrictor y cierre del caño protector (Figura 1).
- o Dos (2) segmentos de manguera de PVC TPU 6*1 10 bar, 1/4", con porción enrollada (Figura 12b)
- o 1 tubo de permeación (o cápsula) relleno de gas SF₆ (Figura 5).
- o 1 lanza-bolos manual (Figura 5).
- o Precintos plásticos (también llamados sunchos) descartables (Figura 1). Aproximadamente 50 por animal.
- o "Mochila" donde colocar los tubos en el lomo del animal (Figura 6). Tela gabardina hacia afuera y neopreno acolchado contra el lomo, con cinchas que permiten ajuste a diferentes tamaños de animal.

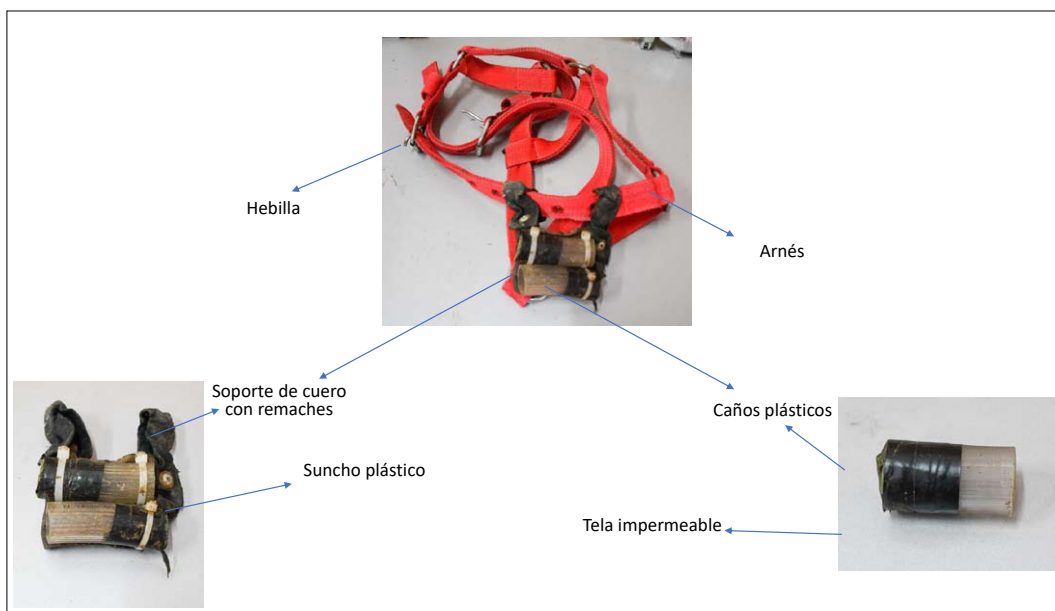


Figura 1. Detalles del arnés, soporte de cuero y caños plásticos.

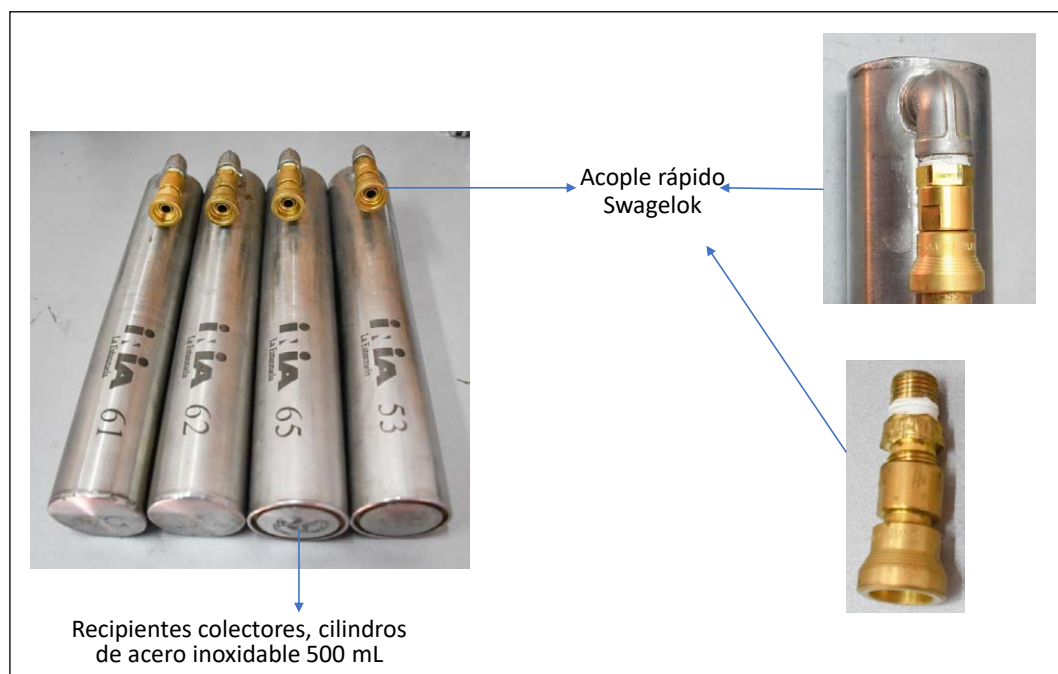


Figura 2. Detalles del tubo colector de metano; acople rápido Swagelok y porta-tubos; tubo colector con unión lateral en L.

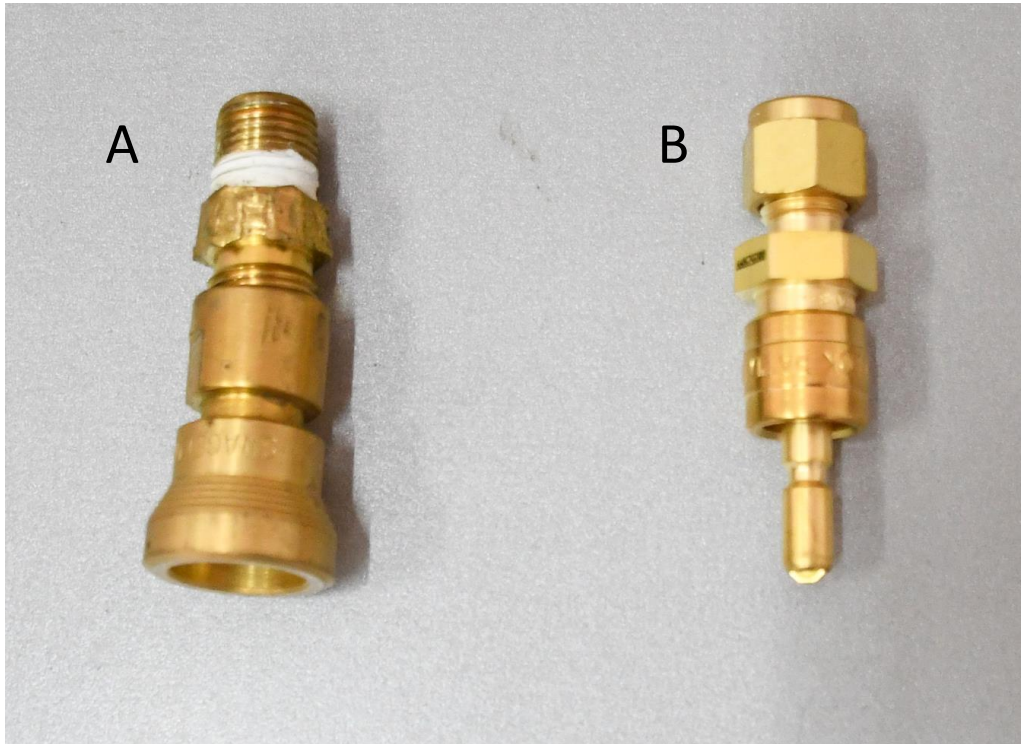


Figura 3. a) Acople rápido hembra Swagelok b) Acople rápido macho Swagelok

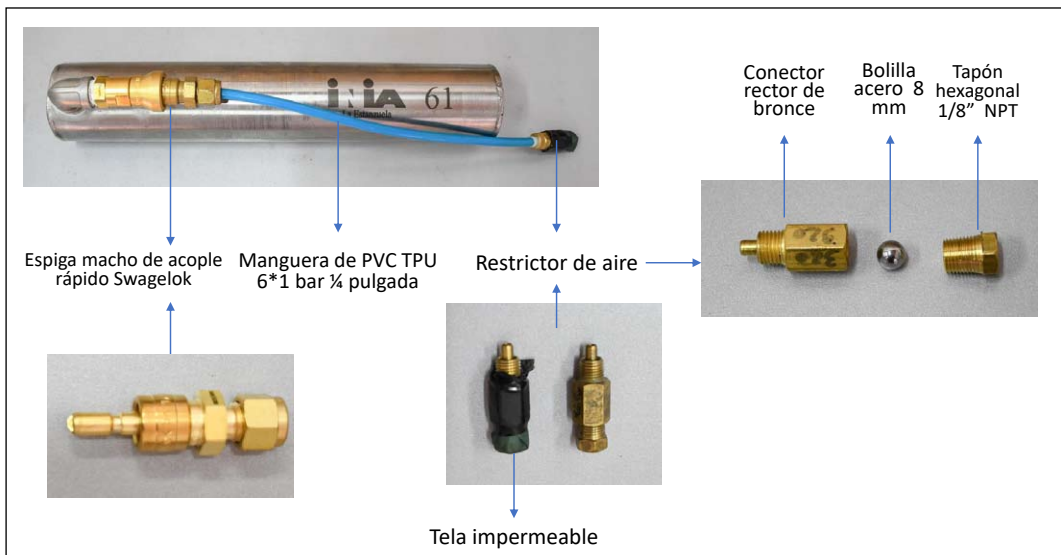


Figura 4. Detalles del restrictor de flujo, manguera y espiga macho.

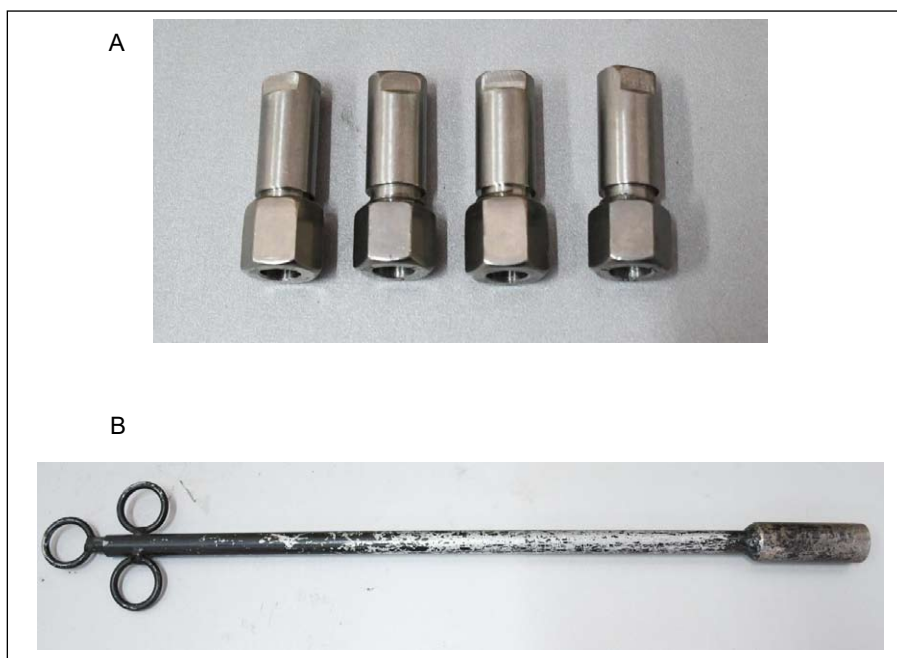


Figura 5. Tubos de permeación y lanza-bolos metálico.



Figura 6. “Mochila” para colocación de tubos colectores en lomo del animal. Diseño INIA.

3. Instalaciones, equipos y materiales de laboratorio

- Baño de agua (María) a 39 °C (Figura 7).
- Balanza de precisión con capacidad de medir a la décima de mg.
- Tubos Eppendorf 50 mL con tapa rosca y rack porta-tubos (Figura 7).
- 1 retículo de vacío construido con: a. caños de cobre sin costura ¼"; b. llaves de paso ¼" Swagelok código B-42S4; c. Unión en cruz ¼" Swagelok código B-400-4; d. Uniones Tee ¼" Swagelok código B-400-3; 5. Acople hembra con válvula de retención /conectores con retención ¼" (macho) Swagelok código B-QC4-D-400; y 6. Manguera de PVC TPU 6*1 10 bar, de ¼ pulgada (Figura 8a).
- 1 bomba de vacío ½ HP, Humm Vac 6 CFM, 50/60 Hz.
- 1 soporte de madera para instalar piezas del retículo de vacío (Figura 8a).
- 1 vacuómetro tipo (Figura 8b), para medir flujo de entrada de aire en los restrictores.
- 1 manómetro Digital (Figura 8b). para medir presión en los tubos.
- 1 tubo de Nitrógeno (N₂) de alta pureza con regulador de presión con conexión al retículo de vacío (Figura 9).
- Viales para gas de modelo y tamaño que correspondan al GC a utilizar.
- Jeringa plástica descartable de 10 ó 20 mL c/ aguja.
- Llave de tres vías para conectar a Jeringa.
- Gafas de seguridad.



Figura 7. Detalles del "Baño María", tubos Eppendorf y balanza.

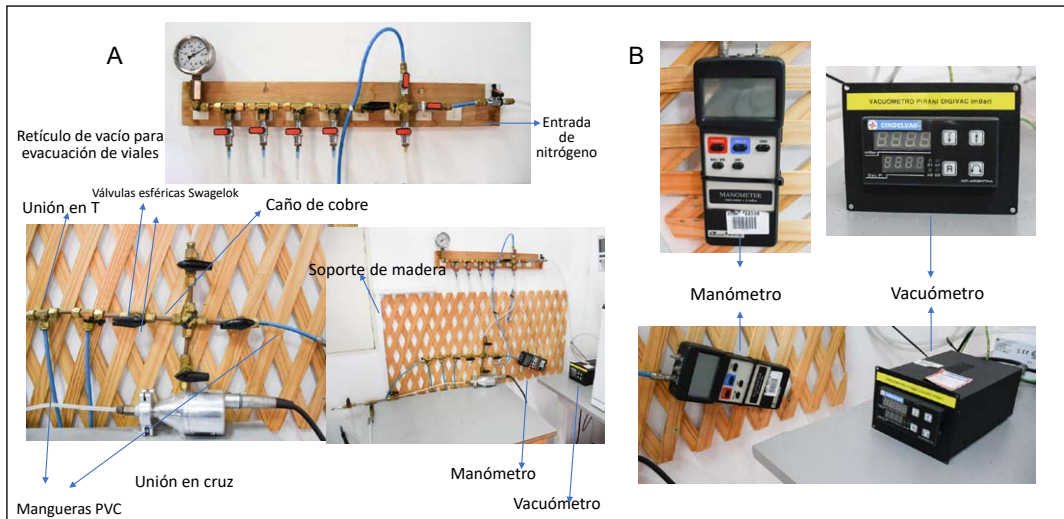


Figura 8. (a) detalles del Retículo de vacío; (b) detalles de Manómetro y Vacuómetro.



Figura 9. Tubo de gas N₂ alta pureza.

4. Procedimiento

4.1. Calibración de tubos de permeación SF₆ para cálculo de Tasa de Liberación de SF₆ en rumen.

- Al menos cinco semanas antes del comienzo del experimento configurar el Baño de agua a 39°C.
- Registrar el peso inicial de los tubos de permeación (con precisión de al menos 0,001 mg) y colocar cada tubo dentro de un tubo Eppendorf.
- Colocar los tubos en rack porta-tubos y ubicarlos dentro del Baño de agua a 39°C.
- Al siguiente día, retirar cada tubo de permeación, registrar su peso y volver a colocar en el tubo Eppendorf y al Baño de agua (tener precaución de no mojar los tubos pues esto altera su peso). Realizar este procedimiento cada tres días a la misma hora durante las cinco semanas y completar los registros.
- Graficar el peso de cada tubo de permeación vs. el tiempo y calcular la tasa de liberación expresándola en mg/día. Registrar los valores de la tasa calculada para cada tubo para luego incluirla en los cálculos de emisión de CH₄ al final del experimento.

4.2. Período de adaptación de los animales

- Trasladar los animales a las instalaciones de campo o mangas. Mantener buenas prácticas de bienestar animal durante todo el procedimiento y período experimental. Los animales necesitan acostumbrarse al manejo que recibirán y confiar en las personas que trabajarán con ellos. Es importante evitar conductas humanas (gritos, silbidos, etc) y/o utilización de perros, que alteren su comportamiento y los pongan nerviosos, y minimizar la cantidad de personas que trabajarán alrededor de los animales.
- Colocar arnés en la cabeza del animal. Ajustar hebilla. Complementar ajuste con precintos plásticos.

4.2.a. *En el caso de experimentos que utilizarán tubos colectores alrededor del cuello del animal:*

- colocar un caño de plástico corrugado alrededor del cuello, por detrás de las orejas, y sujetarlo al arnés con precintos plásticos. Dejar a los animales con arnés y caño corrugado colocados por al menos tres días para que se adapten a la presencia de objetos extraños sobre su cuello y cabeza (Figura 10a);
- observar la respuesta de los animales a la presencia del arnés y caño corrugado e identificar y descartar animales de temperamento fuerte o con alguna característica que no permita su inclusión en la experimentación;
- retirar los caños corrugados al final de este período de adaptación.

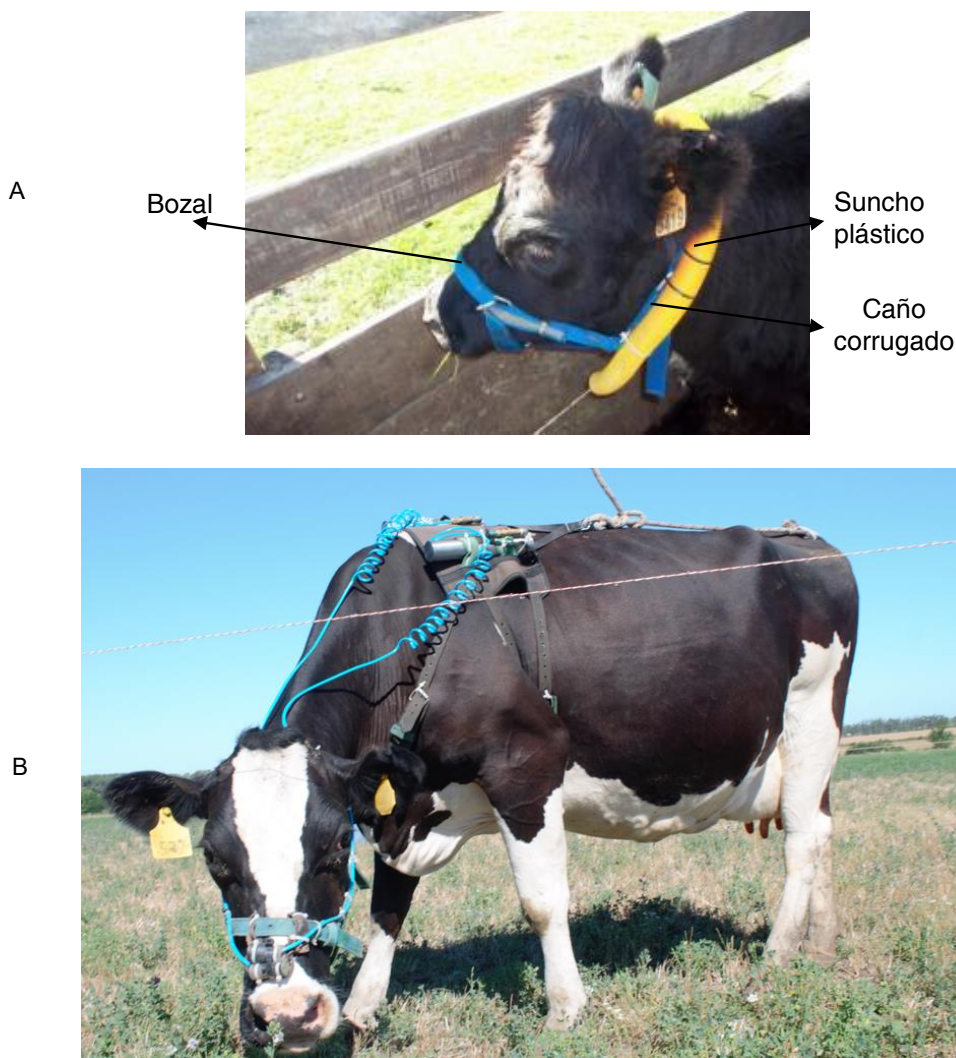


Figura 10 A). Disposición de implementos en los animales durante período de adaptación.
 B) Disposición de implementos en el lomo en la "mochila". Foto tomada por estudiantes del IPA, Udelar.

4.2.b. En el caso de experimentos que utilizarán tubos colectores colocados en una "mochila" en el lomo del animal:

- Colocar la mochila uno o dos días antes de comienzo del período de medición (Figura 10b);
- Observar que las cintas de la mochila no lastiman al animal por el roce;
- Asegurarse que la mochila no se desliza hacia los laterales.

4.3. Colocación de Tubos de Permeación de SF₆ en el rumen

- Realizar este procedimiento al menos 10 días antes del inicio de la colecta de CH₄, para lograr una estabilización de la concentración de SF₆ en el rumen.
- Utilizar tubos de permeación calibrados con tasa de permeación conocida (Figura 5).
- Colocar el tubo de permeación en el lanza-bolo e introducirlo en la boca del rumiante, expulsarlo, y asegurarse que el animal tragó el tubo.
- Registrar identificación del animal y del tubo de permeación introducido en el mismo.

4.4. Preparación de los Tubos Colectores de Metano.

- Colocar acople hembra Swagelok en rosca del tubo colector utilizando teflón en cinta o líquido.
- Realizar vacío en cada tubo colector: para esto conectar cada cilindro al retículo de vacío (conexión acople hembra del tubo con el acople macho, encender bomba de vacío hasta que el manómetro indique 0 mbar.
- Chequear estanqueidad (i.e. conservación del vacío efectuado) de los tubos colectores. Para esto, cinco días después del vaciado conectar los tubos evacuados al retículo de vacío y chequear su presión con el vacuómetro. La presión no debe ser superior a 0 mbar. Seleccionar sólo aquellos tubos que mantuvieron estanqueidad. Los que no mantuvieron estanqueidad deben ser reparados y se repite el procedimiento hasta que mantengan el vacío o de lo contrario se deben descartar.
- Limpiar los tubos recolectores seleccionados con gas Nitrógeno y volver a evacuar. Para esto conectar cada tubo al retículo de vacío habilitando las llaves de entrada del N₂ y llenar hasta que el manómetro indique un valor de 1000-1200 mbar; cerrar llave de pasaje del N₂ y volver a evacuar nuevamente los tubos.
- Armar acople macho con su respectiva manguera. Cortar la manguera del largo que se va a utilizar en los animales. El acople macho consta de una espiga, una virola y una tuerca con orificio para el pasaje de la manguera de ¼. Se sujeta la espiga en una morza, se coloca la virola y luego la manguera, se pasa la tuerca por la manguera y se ajusta a la espiga dándole una vuelta y media de rosca. Luego se le coloca a la tuerca agua jabonosa y se pasa aire comprimido utilizado un compresor de aire conectado en el extremo libre de la manguera. Si no se observan burbujas, se descartan fugas de aire y se considera al acople listo para ser utilizado. Si se observan burbujas, es necesario ajustar más la tuerca o reemplazar la virola.

4.5 Preparación y Ajuste de Restrictores de Flujo.

- Ajustar entrada de aire o conductancia (**C**, mL s⁻¹) de cada restrictor para llenar el tubo colector de volumen 0.5 L (**V**) según período de colección de gas (**T**, días) a realizar en el experimento, con el objetivo de alcanzar una presión final (**Pf**, mbar) en el tubo colector de 500 (+/- 100) mbar.

Para esto: 1. Calcular la **C** óptima necesaria para el experimento utilizando la ecuación:

$$C = (V/p_0) * (\Delta p / \Delta T) \text{ (Gere, 2012);}$$

Ejemplo: $V=500 \text{ mL}$, $P_f=500 \text{ mbar}$, $T= 5 \text{ días (=432000 segundos)}$

$$C_{\text{ejemplo}} = (500 * 500) / 432000 = 0.579 \text{ mL/s}$$

- Medir la C de cada restrictor.
- Armar los restrictores de flujo que constan de tres piezas: a. adaptador de bronce para manguera de ¼; b. bolilla metálica de 8 mm; c. y tapón de cabeza hexagonal (Figura 4).
- Armar un sistema de vacío como muestra la Figura 8a para el ajuste de los restrictores de flujo. En un sistema de vacío completo es necesario que la llave de paso 1 esté conectada directamente a la bomba de vacío, la llave de paso 2 al vacuómetro y la llave de paso 3 al restrictor de flujo (cuando se ajuste el restrictor).
- Vaciar completamente el sistema.
- Para ajustar el restrictor, encender el vacuómetro y la bomba de vacío con las llaves 1 y 2 abiertas y la llave 3 cerrada. Dejar que el sistema se vacíe durante un mínimo de 20 minutos. Una vez que el vacuómetro esté estable, se debe registrar ese valor, el que será la base para regular los restrictores. A medida que pasa el tiempo y la bomba de vacío se mantiene encendida, este valor puede ir aumentando debido al calentamiento de la misma. Si el valor cambia se anota el nuevo valor como base.
- Seguido, conectar un restrictor a la llave de paso 3, la que estaba cerrada, e inmediatamente abrir esta llave. Esperar a que la lectura del vacuómetro se estabilice.
- Con ayuda de llaves de boca (medidas 1 ½ y 7/16) girar el tapón a modo de abrir o cerrar la entrada de aire al sistema: trabajar con movimientos muy suaves y pequeños y sin quitar la mirada del display del vacuómetro. Este ajuste se realiza para lograr que el valor de la lectura del vacuómetro se aproxime al valor inicial, es decir al valor registrado y anotado cuando el sistema estaba totalmente vacío. Esperar a que la lectura del vacuómetro se estabilice (esto puede llevar unos minutos). A modo de ejemplo, si el valor base del vacío del sistema es $4 \times 10^{-2} \text{ mbar}$, es necesario que cuando se coloca el restrictor y se abre la llave 3, se obtenga un valor $4.5 \times 10^{-2} \text{ mbar}$, es decir 0.005 mbar por encima del valor del vacío total del sistema. Esto significa que se ha generado una diferencia entre el valor inicial y el valor de la apertura del restrictor que indica que hay entrada de aire a través de este. Este es un número aproximado y es necesario realizar pruebas para saber la apertura aproximada necesaria entre el vacío inicial y la presión que pasa por el restrictor.
- Cuando se logra tener la diferencia mencionada entre el valor del vacío del sistema de retículo y el del restrictor, se cierra la llave 1. Dejar pasar unos segundos observando que la lectura del vacuómetro comienza a aumentar. Cuando ese incremento es constante y estable, observar si se logra un aumento de flujo de 1 mbar en 10 segundos, utilizando un cronómetro. Si esto se cumple, se cierra la llave 3 y se abre la llave 1. Retirar el restrictor.

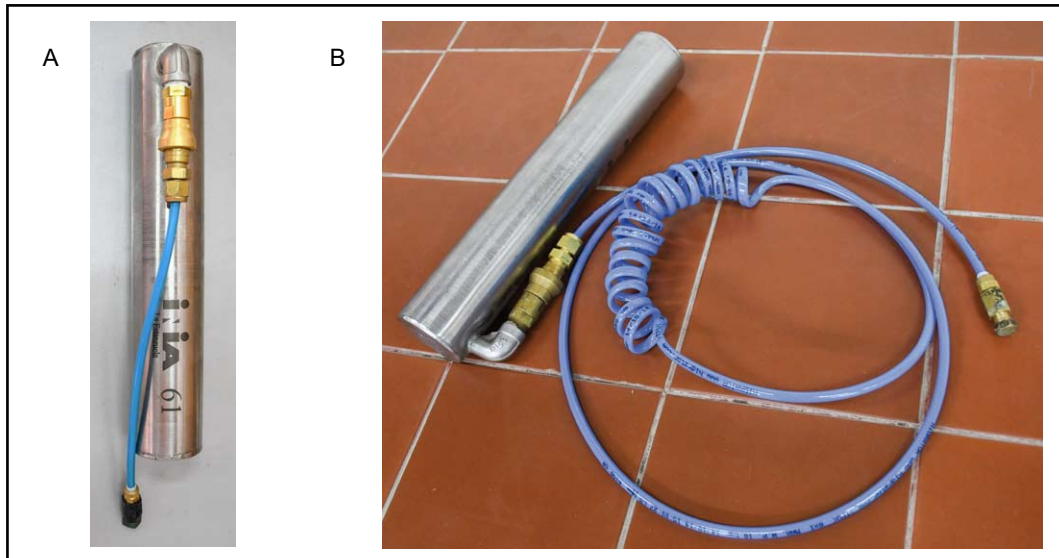


Figura 11. A) Tubo colector conectado con espiga, manguera corta y restrictor que se deja por 5 días para probar restrictores (cubiertos por tela impermeable). B) Tubo colector conectado con espiga, manguera larga con porción enrollada y restrictor que se deja por 5 días para probar restrictores.

Los restrictores de flujo que cumplan con esta condición se apartan a la espera de ser probados en los tubos colectores. Con el acople macho ya armado se conecta el restrictor de aire al extremo libre de la manguera y se ajusta por medio de una tuerca con valona de nylon (Figura 11).

- Se conecta la espiga al conector hembra del tubo colector de 500 mL, el que ya se encuentra al vacío, y se deja probando durante 5 días.
- Inmediatamente pasados los 5 días, se mide presión de los tubos. Aquellos tubos colectores en los que se mide y obtiene un valor de presión en el rango de 400-600 mbar, están en condiciones de ser reservados para ser utilizados en el experimento. Los tubos colectores en los que se midió una presión por encima o por debajo de ese rango, deberán ser recalibrados.

4.6 Colocación de los Tubos Colectores de Metano en los animales.

4.6a. *En experimentos que utilicen arnés y tubos colectores a cada lado de la cabeza del animal:*

- Numerar los porta-tubos.
- Insertar cada tubo colector en un porta-tubo ya numerado.
- Utilizar dos porta-tubos con tubos colectores por animal.
- Colocarlos a cada lado de la cabeza/cuello del animal sujetándolos al bozal con precintos plásticos al porta-tubo. (Figura 12).
- Conectar la espiga (conector macho) con la manguera y el restrictor al acople hembra del tubo colector.

- Pasar la manguera hacia el otro costado del animal sujetándola al arnés con precintos plásticos y colocar el otro extremo de la manguera de PVC (restringidor de entrada de aire) bien cerca de los ollares del animal dentro de un trozo de caño transparente de PVC. Este caño debe estar sellado en un extremo con tela impermeable al agua y permeable al aire. El caño de PVC estará sujeto al soporte de cuero enganchado al arnés (Figura 13 y 14).
- Registrar identificación (número) del animal, número de porta-tubos y tubo colector correspondiente, número de restrictor correspondiente a cada tubo, día y hora de instalación.

4.6b. En experimentos que utilicen mochila y tubos colectores en el lomo del animal.

- Colocar mochila. Asegurar cada hebilla con precintos.
- Colocar tubos colectores en mochilas (Figura 15).
- Colocar bozal. Asegurar con precintos.
- Colocar restrictor de entrada de aire en manguera de PVC bien cerca de los ollares del animal dentro de un trozo de caño transparente de PVC. Este caño debe estar sellado en un extremo con tela impermeable al agua y permeable al aire. El caño de PVC estará sujeto al soporte de cuero enganchado al arnés (Figura 13 y 14).
- Conectar la espiga (conector macho) de la manguera al acople hembra del tubo colector. Sujetar con precintos la manguera al bozal.
- Registrar identificación (número) del animal, número de tubo colector correspondiente, número de restrictor correspondiente a cada tubo, día y hora de instalación.

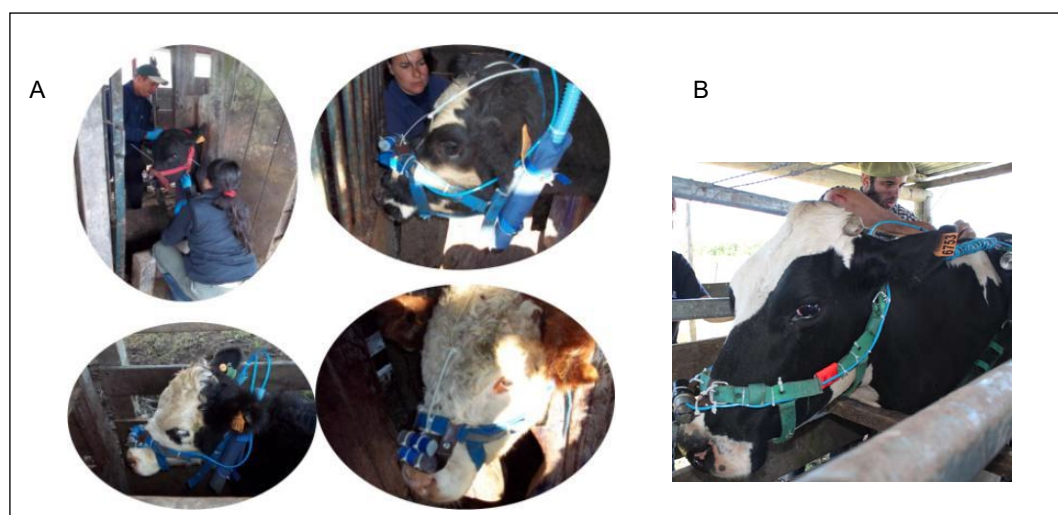


Figura 12. A) Detalles de la colocación a cada lado de la cabeza de los tubos colectores en sus porta-tubos y de los restrictores de flujo. B) Detalles de la colocación en la mochila sobre el lomo de los tubos colectores y de los restrictores de flujo (foto tomada por estudiantes de IPAV, Udelar).

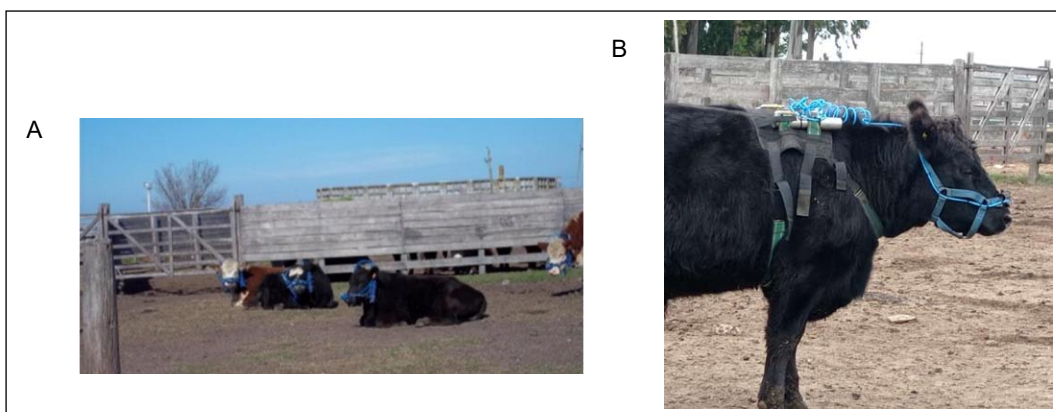


Figura 13. A) Animales con arnés, tubos colectores y restrictores de flujo. B) Animales con arnés de mochila sobre el lomo, tubos colectores y restrictores de flujo.



Figura 14. Colocación de mochila y tubos colectores. Foto tomada por estudiantes del IPAV, Udelar.

4.7 Retiro de tubos colectores, extracción de muestras y stock de submuestras.

- Al final del período de colección de gas establecido para el experimento, retirar conjuntamente los tubos colectores con los acoples o mochilas, mangueras PVC y restrictores de aire.
- Desconectar, del tubo colector, la espiga de la manguera de PVC con restrictor.
- Chequear estado de tubos, acoples y mangueras. Descartar materiales con averías que hayan dificultado la colecta de gas.
- Conectar cada tubo colector al retículo de vacío, medir su presión utilizando el manómetro y registrar valor en mbar (Presión inicial, **Pi**). Descartar los tubos con valores de presión próximos al valor de presión atmosférica.
- Los tubos colectores que presentaron adecuada presión post colecta deben ser sobrepresurizados con N_2 . Para esto, conectar cada tubo al retículo de vacío y habilitar las llaves de entrada del N_2 y llenar cada tubo colector (1000-1200 mbar aprox.). Registrar valor de presión (Presión final, **Pf**)
- Elaborar un “adaptador” o pieza de acople al tubo colector que permita la extracción de la muestra desde el tubo y el llenado de los viales, los cuales serán luego utilizados para el análisis de la muestra en el cromatógrafo de gases (GC). Esto se puede realizar utilizando una manguera de PVC (TPU 6*1 10 bar, de 1/4 pulgada) de 50 cm aprox. En un extremo colocarle espiga o conector macho Swagelok; en el otro extremo colocar una mariposa de tres vías: vía 1 conectada a manguera PVC, vía 2 conectada a una jeringa de 20 mL, y vía 3 conectada a una aguja (Figura 16).
- Luego de armado el “adaptador”, conectar la espiga del “adaptador” al acople hembra del tubo colector con la mariposa de tres vías con el pasaje de aire cerrado hacia jeringa y aguja.
- Para extraer cada submuestra: 1. Habilitar con la mariposa el pasaje de aire del tubo colector hacia la jeringa hasta que complete los 20 mL, y cerrar mariposa; 2. Insertar la aguja en la septa de un vial de 12 mL previamente vaciado; 3. Abrir el pasaje de la muestra de la jeringa hacia el vial (a través de la aguja) y cerrar luego que la jeringa vació su contenido en el vial; 4. Retirar el vial (el mismo quedará a sobrepresión), y 5. Identificar el número de cada vial, asociado al número de tubo/muestra.
- Repetir esta operación tantas veces como submuestras se planifican obtener (recomendable de 3 a 5 submuestras).
- Descartar la primera submuestra extraída ya que el volumen residual de la manguera puede alterar las concentraciones.
- Importante: mientras se están colectando las submuestras de un tubo colector para pasarlas a los viales, nunca retirar ni el “adaptador” ni la mariposa con sus vías.
- Enviar los viales conteniendo las submuestras a sobrepresión para el análisis de su concentración de CH_4 y SF_6 por cromatografía gaseosa.

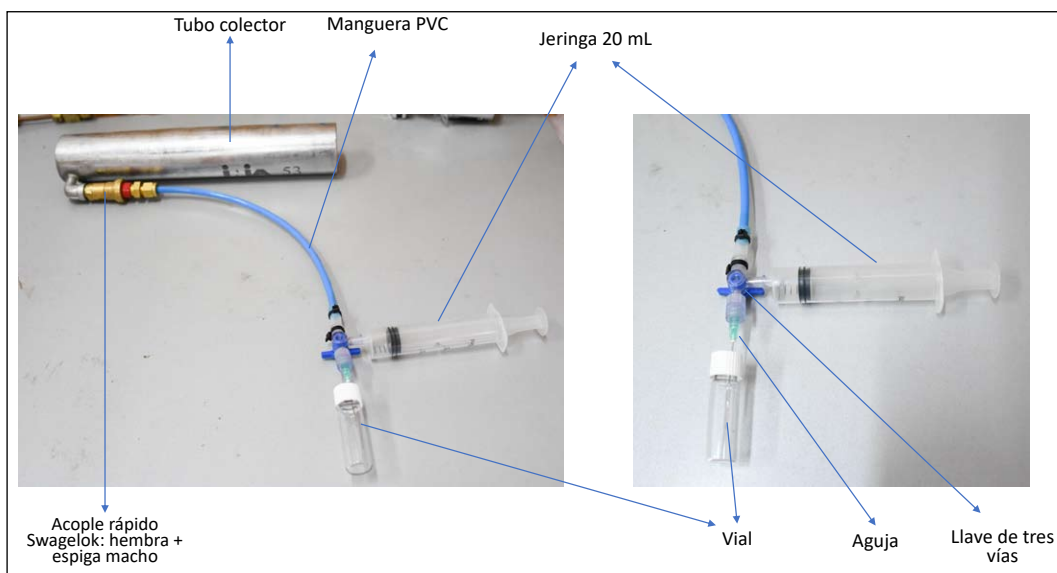


Figura 15. Detalles del “Adaptador” utilizado para submuestrear el gas contenido en el tubo colector y pasarlo a viales de vidrio.

4.8 Limpieza de tubos colectores y re-acondicionamiento.

- Realizar vacío en cada tubo colector: para esto conectar cada tubo al retículo de vacío (conexión acople hembra del tubo con macho de la espiga del retículo), encender bomba de vacío hasta que el vacuómetro indique 0,5 mbar (Figura 17).
- Antes de volver a utilizar los tubos colectores limpiarlos con gas Nitrógeno y volver a evacuar. Para esto dejar conectados los tubos al retículo de vacío habilitando las llaves de entrada del N₂ y llenar hasta que el manómetro indique un valor no menor de 1000-1200 mbar; volver a evacuar nuevamente los tubos.
- Esta operación se puede repetir hasta tres veces para minimizar los niveles residuales de CH₄ y SF₆ en el tubo colector.



Figura 16. Tubos colectores de metano conectados al retículo de vacío para ser evacuados y limpiados con N₂.

Nota 1. Es necesario la inclusión en el estudio de al menos un tubo colector “control” colocado en un sitio cercano al experimento para conocer los valores atmosféricos de [CH₄] y [SF₆], que luego permitirán calcular en forma correcta la emisión de CH₄ de cada animal.

Nota 2. Es recomendable la inclusión en el estudio de 1 ó 2 “animales control”: se les colecta el CH₄ al igual que al resto de los animales en experimentación, pero no se los dosifica con tubo de permeación de SF₆.

5. Cálculo de la emisión de CH₄

- Disponer de la tasa de liberación de SF₆ (SF_{6 TL}) de cada tubo de permeación correspondiente a cada animal (ver más arriba, punto 4.1).
- Disponer de los valores de concentración de CH₄ (ppm) y de SF₆ (ppt) de cada submuestra colectada en viales y analizadas por cromatografía gaseosa.
- Calcular factor de corrección (**FC**) de las concentraciones (debido a la dilución realizada por la sobrepresurización de los tubos colectores con N₂) utilizando **Pi** y **Pf** (ver punto 4.7): **FC= PF/Pi**. Multiplicar cada concentración por **FC**.
- Una vez corregidas las concentraciones de CH₄ y SF₆ entéricos (CH_{4 ent} y SF_{6 ent}) de las submuestras colectadas de los animales y las concentraciones del tubo control (CH_{4 atm} y SF_{6 atm}), calcular la emisión diaria de CH₄ entérico utilizando la siguiente ecuación que incluye la corrección por los pesos moleculares de cada gas (PM CH₄ = 16 y PM SF₆ = 146):

$$\text{CH}_4 \text{ (g día}^{-1}\text{)} = \text{SF}_{6\text{TL}} \text{ (mg día}^{-1}\text{)} * \left[\frac{\text{CH}_{4\text{ent}} - \text{CH}_{4\text{atm}} \text{ (ppm)}}{\text{SF}_{6\text{ent}} - \text{SF}_{6\text{atm}}} \text{ (ppt)} \right] * \left[\frac{16 \text{ (PM CH}_4\text{)}}{146 \text{ (PM SF}_6\text{)}} \right] * 1000$$

6. Proveedores Sugeridos

- Swagelok
- Hidrator
- Pirani
- Cassucci
- Labco
- Tornero: Danilo Rodríguez (Tarariras, Colonia)

7. Referencias

- **Gere J.** 2012. La técnica de trazado por SF₆ para medir emisiones de metano de rumiantes en pastoreo: Desarrollos metodológicos y algunas aplicaciones. Tesis Doctoral. Tandil, Argentina. Facultad de Ciencias Exactas. UNCPBA. 142 p.
- **Gere J, Gratton R.** 2010. Simple, Low-Cost flow controllers for time averaged atmospheric sampling and other applications. Latin American Applied Research. 40: 377-382.
- **Grainger C, Clarke T, McGinn S, Auldism M, Beauchemin K, Hannah M, Waghorn G, Clark H, Eckard R.** 2007. Methane Emissions from Dairy Cows Measured Using the Sulfur Hexafluoride (SF₆) Tracer and Chamber Techniques. Journal of Dairy Science. 90: 2755-2766.
- **Hammond, K.J., Waghorn, G.C. and Hegarty, R.S.,** 2016. The GreenFeed system for measurement of enteric methane emission from cattle. Animal Production Science, 56(3), pp.181-189.
- **Johnson K, Johnson D.** 1995. Methane emissions from cattle. Journal Animal Science. 73: 2483-2492.
- **Johnson K, Westberg H, Michal J, Cossalman M.** 2007. The SF₆ tracer technique: methane measurement from ruminants. In: Measuring Methane Production from Ruminants. Makkar H, Vercoe P. [http://www.ansci.wsu.edu/People/johnson/Documents/SF₆Technique.pdf](http://www.ansci.wsu.edu/People/johnson/Documents/SF6Technique.pdf).
- **Lassey K, Ulyatt M, Martin R, Walker C, Shelton I.** 1997. Methane emissions measured directly from grazing livestock in New Zealand. Atmospheric Environment. 31: 2905-2914.
- **Pinares-Patiño, C.S., Lassey, K.R., Martin, R.J., Molano, G., Fernandez, M., MacLean, S., Sandoval, E., Luo, D. and Clark, H.,** 2011. Assessment of the sulphur hexafluoride (SF₆) tracer technique using respiration chambers for estimation of methane emissions from sheep. Animal Feed Science and Technology, 166, pp.201-209.
- **Storm, I.M., Hellwing, A.L.F., Nielsen, N.I. and Madsen, J.,** 2012. Methods for measuring and estimating methane emission from ruminants. Animals, 2(2), pp.160-183.
- **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

INIA Dirección Nacional
Avda. Italia 6201,
Ed. Los Guayabos,
Parque Tecnológico LATU.
Montevideo
Tel: 2605 6021
inia@inia.org.uy

INIA La Estanzuela
Ruta 50, Km 11
Colonia
Tel. 598 4574 8000
Fax 598 4522 4061
iniale@le.inia.org.uy

INIA Las Brujas
Ruta 48, Km 10
Canelones
Tel. 598 2367 7641
Fax 598 2367 7609
inia_lb@lb.inia.org.uy

INIA Salto Grande
Camino al Terrible
Salto
Tel. 598 4733 5156
Fax 598 4732 9624
inia_sg@sg.inia.org.uy

INIA Tacuarembó
Ruta 5, Km 386
Tacuarembó
Tel. 598 4632 2407
Fax 598 4632 3969
iniatbo@tb.inia.org.uy

INIA Treinta y Tres
Ruta 8, Km 281
Treinta y Tres
Tel. 598 4452 2305
Fax 598 4452 5701
iniatt@tyt.inia.org.uy

www.inia.uy