

# Metaanálisis y sostenibilidad consecuentes con el uso de urea de liberación controlada en vacuno lechero

Saheed A. Salami<sup>1\*</sup>, Colm A. Moran<sup>2</sup>, Helen E. Warren<sup>3</sup>, Jules Taylor-Pickard<sup>3</sup>

**1** Solutions Deployment Team, Alltech (UK) Ltd., Stamford, United Kingdom, **2** Regulatory Affairs Department, Alltech SARL, Vire, France, **3** Alltech Biotechnology Centre, Dunboyne, Ireland

\* [saheed.salami@alltech.com](mailto:saheed.salami@alltech.com)



## Resumen

La urea de liberación controlada (ULC) es una fuente de compuesto nitrogenado no proteico (NNP) para suministrar proteína degradable en el rumen en la nutrición de los rumiantes. Se realizó un metaanálisis para evaluar los efectos de sustituir fuentes de proteína vegetal por ULC (Optigen®, Alltech Inc., USA) sobre el rendimiento productivo de las vacas lecheras. Adicionalmente, se analizó el impacto de la suplementación con ULC en la sostenibilidad de la producción de leche mediante la cuantificación de la huella de carbono (CHC) del uso del alimento en la producción lechera y de la excreción de nitrógeno (N) en el estiércol de vacas lecheras. Los datos de la composición de la dieta y de las variables del rendimiento fueron extraídas de 17 experimentos con 44 comparaciones de dietas (control vs ULC). Fueron aplicados un modelo mixto lineal y un modelo de regresión lineal para analizar estadísticamente el efecto de ULC en la ingesta del alimento y el rendimiento productivo. La suplementación con ULC disminuyó ( $P < 0.05$ ) la ingesta de materia seca (IMS, -500 g/d) y la ingesta de N (IN, -20 g/d). No hubo ningún efecto significativo ( $P > 0.05$ ) sobre el rendimiento de la leche, la leche corregida en grasa, la leche corregida por energía, ni en la grasa de la leche ni en la composición de la proteína. Sin embargo, la suplementación con ULC mejoró ( $P < 0.05$ ) la eficiencia alimentaria (+3%) y la eficiencia del uso del N (EUN, +4%). Los análisis de regresión revelaron que aumentar el nivel de inclusión de ULC disminuyó la IMS y la IN mientras que aumentar la proteína bruta (PB) de la dieta aumentó ambos parámetros. Sin embargo, la producción de leche y la eficiencia alimentaria aumentaron, en respuesta a los niveles crecientes de inclusión de ULC y de PB de la dieta. La EUN tuvo una relación positiva con el nivel de ULC mientras que la EUN disminuyó con el aumento de la PB de la dieta. La inclusión de ULC en las dietas de ganado lechero redujo la huella de carbono (HC) del uso del alimento en la producción de leche -14.5%; 373,13 vs 319,15 g CO<sub>2</sub> eq/kg leche). Además, la suplementación con ULC disminuyó la excreción de N en el estiércol entre un 2,7% hasta un 3,1% (-12 a -13 g/vaca/d) y la intensidad de la excreción de nitrógeno entre un 3,6% hasta 4% (-0,50 a -0,53 g N/kg leche). En conclusión, la suplementación con ULC puede contribuir a una producción sostenible de leche a través de la mejora de la eficiencia de la producción y la reducción de los impactos sobre el medio ambiente.

## OPEN ACCESS

**Citation:** Salami SA, Moran CA, Warren HE, Taylor-Pickard J (2021) Meta-analysis and sustainability of feeding slow-release urea in dairy production. PLoS ONE 16(2): e0246922. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0246922>

**Editor:** Juan J. Llor, University of Illinois, UNITED STATES

**Received:** June 21, 2020

**Accepted:** January 28, 2021

**Published:** February 12, 2021

**Copyright:** © 2021 Salami et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper and its [Supporting Information](#) files.

**Funding:** This study was funded by Alltech Inc., the company which produces and markets the slow-release urea evaluated in this study. The funder provided support in the form of salaries for authors (SAS, CAM, HEW, and JT-P) but did not have any additional role in the study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. The specific roles of

## Introducción

Existe un creciente interés por optimizar la utilización de la proteína en la dieta de las vacas lecheras para potenciar la eficiencia de la producción, reducir el coste de alimentación y mitigar los impactos medioambientales de la producción lechera. Suministrar proteína en la dieta de las vacas lecheras implica la reformulación de las dietas con un equilibrio entre la proteína degradable en el rumen (PDR) y la proteína no degradable en el rumen (PNDR) para satisfacer los requerimientos nutricionales de los animales. La hidrólisis ruminal de la PDR libera amoníaco en el rumen y se sincroniza con la obtención de energía fermentable para sintetizar proteína bruta microbiana (PBM) [1]. La PBM es una proteína de alta calidad con un perfil de alta digestibilidad aparente y de aminoácidos balanceados [2]. La PBM aporta la mayoría de la PB que fluye hacia el intestino delgado, y la combinación de PBM y de PNDR constituyen la proteína metabolizable que es digerida

these authors are articulated in the 'author contributions' section.

**Competing interests:** The authors (SAS, CAM, HEW, and JT-P) are employees of Alltech Inc., the company which produces and markets Optigen®, the commercial slow-release urea evaluated in this study. This does not alter our adherence to PLOS ONE policies on sharing data and materials.

y absorbida en el intestino delgado para satisfacer el requerimiento de aminoácidos de las vacas lecheras [3]. La urea es un compuesto nitrogenado no proteico que puede ser usado para suministrar PDR en las raciones para rumiantes [4]. El coste económico de la urea ha aumentado el interés en su utilización como sustitución parcial de las fuentes de proteína vegetal, como la harina de soja, para suministrar PDR [5]. Sin embargo, la utilización de la urea en la nutrición para rumiantes está limitada por su rápida hidrólisis a amoníaco en el rumen, excediendo la velocidad de la fermentación de carbohidratos en el rumen. La asincronía entre la producción de amoníaco ruminal y la disponibilidad de energía fermentable podría ejercer un efecto negativo sobre la eficiencia de la síntesis de PBM [1]. Por lo tanto, esta circunstancia reduce la cantidad de PBM en el flujo de salida, lo que puede obstaculizar la disponibilidad de proteína metabolizable para la producción de leche [3]. Además, la rápida hidrólisis de la urea en el rumen puede reducir la eficiencia de la utilización de N (EUN, el nitrógeno de la leche como porcentaje de la ingesta total de N) y aumentar la excreción de N [1]. La rápida hidrólisis de la urea también podría elevar la concentración de amoníaco en sangre y aumentar el riesgo de toxicidad del amoníaco [4]. Para aliviar los problemas asociados a la suplementación de las raciones con urea se han utilizado tecnologías de recubrimiento, que permiten desarrollar productos de urea de liberación controlada (ULC), que pueden controlar la degradación de la urea y la liberación de NH<sub>3</sub> en el rumen. Esto podría mejorar la sincronización de la producción ruminal de amoníaco con la digestión de la energía y reducir el coste metabólico de la detoxificación de NH<sub>3</sub> en urea en el hígado [5]. Una extensa revisión de la literatura ha demostrado la eficacia de la ULC como fuente de compuesto nitrogenado no proteico, que mejora la eficiencia de la captura de N en el rumen, la síntesis de proteína microbiana, la digestión de la fibra, y de este modo mejora la producción de leche y de carne por el rumiante [5]. El impacto medioambiental de los sistemas de producción lechera está asociado principalmente a los gases de efecto invernadero (GEI) y a la excreción de N [6,7]. El dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), el metano (CH<sub>4</sub>), y el óxido nitroso (N<sub>2</sub>O) son las principales emisiones de GEI asociadas a la producción agropecuaria y se expresan convencionalmente en términos de CO<sub>2</sub> equivalente (CO<sub>2</sub> eq) por unidad de producto. Las evaluaciones de ciclo de vida han demostrado que las emisiones globales procedentes de la producción de leche generan 1,4 gigatoneladas de CO<sub>2</sub> eq [8] y el sector lechero global representa aproximadamente un 4% de las emisiones totales globales antropogénicas de GEI [9]. El alimento representa una aportación importante de GEI a las emisiones antropogénicas de GEI en la huella de carbono [9]. El alimento representa una aportación importante de GEI a la contabilidad de la huella de carbono (CHC) de los sistemas de producción lechera, y las emisiones relacionadas con los alimentos provienen principalmente de la fertilización de los cultivos para alimentos, la deposición de estiércol en los pastos y de los cambios en el uso de la tierra [8]. La formulación de las dietas lecheras con una menor huella de carbono, es una estrategia potencial para reducir la intensidad global de las emisiones de la producción lechera [10]. Siguiendo esta estrategia, el uso de la ULC como sustitución parcial de la harina de soja y de la harina de semilla de algodón, redujo la huella de carbono de las raciones de ovejas y búfalas lecheras, respectivamente [11,12]. Además, los rumiantes tienen una eficiencia de uso del nitrógeno relativamente baja, excretando de un 60 a un 90% del N ingerido en el estiércol – orina y heces- [13]. El N excretado en el estiércol, en explotaciones lecheras, ha captado las crecientes preocupaciones por el medio ambiente debido a sus efectos en la calidad del agua a través de la lixiviación de nitratos y de la eutrofización, y la liberación posterior de gases como el NH<sub>3</sub> y el N<sub>2</sub>O, que afectan negativamente a la calidad del aire y causan el calentamiento global, respectivamente [14,15]. El efecto positivo de la ULC que mejora la captura del N en el rumen, podría aumentar la cantidad de N retenido en la producción de leche y mejorar la eficiencia de uso del nitrógeno en las vacas lecheras. De este modo, se puede esperar que la suplementación con ULC pueda mejorar la sostenibilidad de la producción lechera, reduciendo la huella de carbono del alimento y la excreción de N en el estiércol. Por lo que sabemos, no existe información acerca de una revisión objetiva que cuantifique los efectos de la ULC en la producción lechera. Un metaanálisis es una técnica cuantitativa que puede ser usada para combinar, de manera sistemática, conjuntos de datos procedentes de múltiples estudios con diferentes diseños de experimentos, con una heterogeneidad de efectos de tratamientos, y permite extraer conclusiones basadas en la evidencia a partir de un corpus de investigaciones [16,17]. En un estudio reciente de un metaanálisis, hemos demostrado que la sustitución parcial de fuentes de proteína vegetal por ULC suministrada en la dieta, mejoró el rendimiento productivo del ganado vacuno de carne en crecimiento y en acabado [18]. Por consiguiente, el objetivo del presente

estudio era aplicar la técnica del metaanálisis en la evaluación retrospectiva de los efectos de la suplementación con ULC sobre el rendimiento productivo de las vacas lecheras. Adicionalmente, fueron estudiados en forma métrica de sostenibilidad de la producción lechera, los impactos consecuentes con la suplementación con ULC sobre la huella de carbono de la alimentación y la excreción de N en el estiércol.

### Materiales y métodos

#### Estrategia de búsqueda de trabajos publicados y selección de los estudios

Este meta-análisis se presenta siguiendo la declaración *Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses* (PRISMA) [19], como puede verse en la Fig. 1. El metaanálisis fue realizado para evaluar el efecto de un producto de ULC de uso comercial (Optigen1, Alltech Inc., Nicholasville, KY, USA) sobre el rendimiento productivo de vacas lecheras. El producto de ULC consiste en urea de recubrimiento uniforme, con una matriz semipermeable vegetal lipídica, con un 88% de urea (41% N, 256% PB) y 11-12% de grasa [18]. El recubrimiento lipídico de la ULC

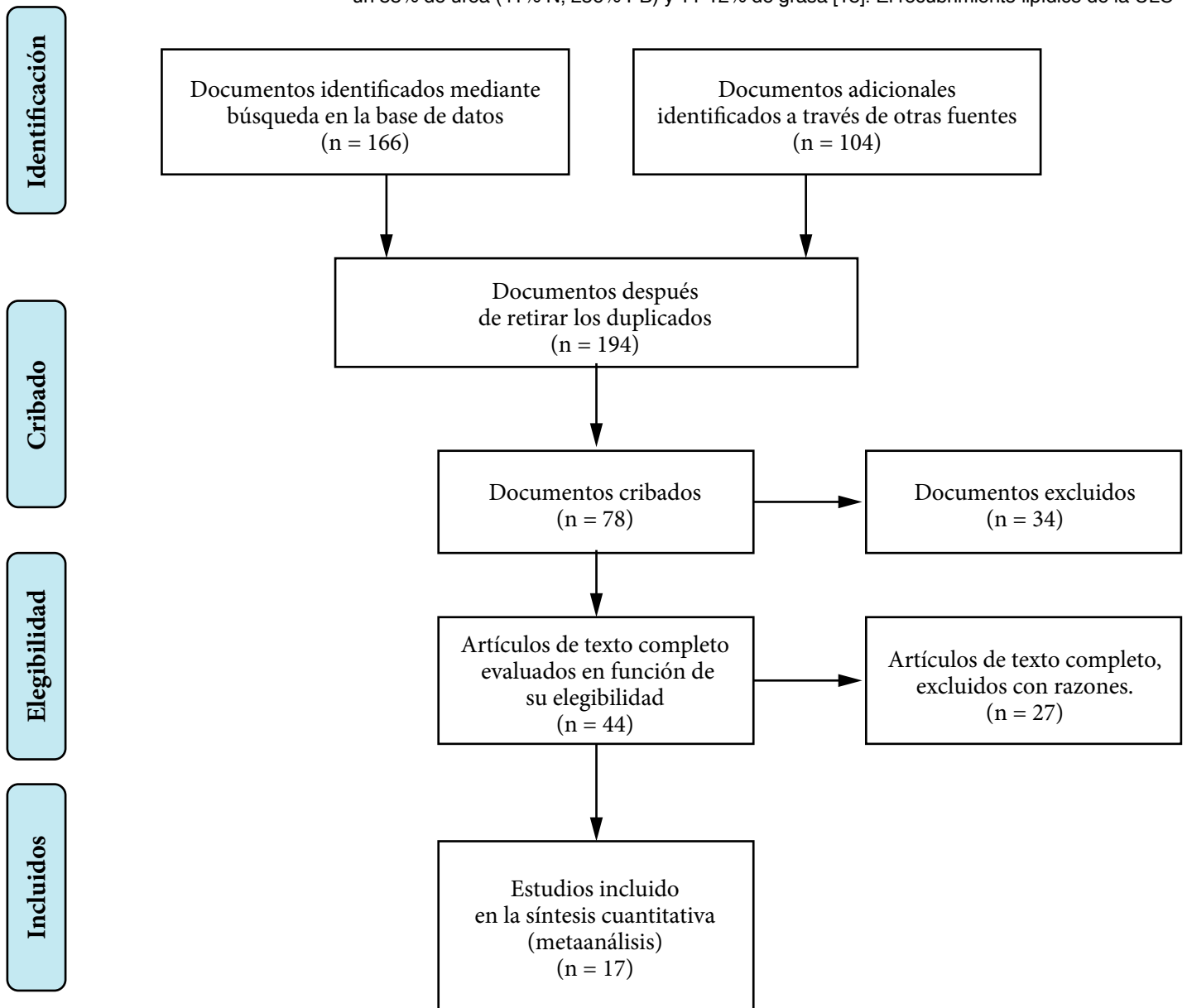


Fig. 1. Un diagrama de flujo de PRISMA, detallando la estrategia de búsqueda de trabajos publicados y de selección de estudios para el metaanálisis.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0246922.g001>

ralentiza la disolución de la urea, reduciendo la tasa de conversión de la urea en  $\text{NH}_3$  en el rumen [20]. Se hizo una búsqueda de trabajos publicados, usando las bases de datos académicas online (Google Scholar, Scopus, PubMed, CAB Direct, Web of Science y Mendeley) para extraer estudios publicados que evalúan el efecto del producto de ULC en las vacas lecheras. La estrategia de búsqueda incluyó las palabras siguientes: “vaca lechera”, “urea de liberación controlada”, “urea recubierta por polímeros”, “Optigen” y “producción de leche”.

No se aplicó ningún filtro por fecha en la búsqueda de trabajos publicados, para abarcar la entera duración del tiempo en el que el producto de ULC ha sido usado en investigación de la nutrición en la industria lechera. Por otra parte, se realizó una búsqueda en la base de datos bibliográficos de la compañía, para extraer informes publicados y no publicados de ensayos, que evaluaran el efecto de la ULC en vacas lecheras. Los informes no publicados de ensayos están vinculados al equipo de investigación de la compañía, lo que permite obtener más información en caso de necesitarla. Los estudios fueron seleccionados después de hacer un cribado de selección conforme a los siguientes criterios: (1) Se informaba sobre el ensayo en inglés; (2) el experimento fue realizado en razas de ganado vacuno de leche; (3) los estudios contenían al menos una dieta control sin ULC y una dieta suplementada con el producto de ULC como sustitución parcial de fuentes de proteína vegetal; (4) se informaba sobre la dosificación de ULC; (5) se proporcionaba la información sobre los ingredientes para piensos incluidos en la composición de las dietas o estaba disponible a petición de los autores; y (6) se proporcionaba la información sobre los parámetros de rendimiento de la producción (ingesta de materia seca (IMS), rendimiento y composición de la leche) o estaba disponible a petición de los autores. Basados en estos criterios, fueron seleccionados 17 estudios para su inclusión en el metaanálisis. Los estudios seleccionados consisten en 11 publicaciones con revisión por pares y 6 estudios no publicados presentados en conferencias internacionales. Los detalles de los estudios experimentales incluidos en el metaanálisis se presentan en la Tabla 1.

### Extracción de datos

Los datos extraídos de los estudios seleccionados, fueron incluidos en una base de datos, en una hoja de cálculo. La base de datos consistió en 44 comparaciones de grupos control y ULC en la dieta. Los datos fueron extraídos en relación con variables como la composición de la dieta, la ingesta de alimento y la respuesta de rendimiento productivo. Las variables de composición de la dieta incluyeron los niveles de inclusión de ingredientes, de ULC, y el nivel de PB en la dieta (%). La ingesta de alimento y las variables de rendimiento de la producción incluyeron IMS (kg/d), la ingesta de N (IN, g/d), el rendimiento en leche (kg/d), leche corregida en grasa (LCG, kg/d), leche corregida por energía (LCE, kg/d), componentes de la leche (% grasa y % proteína), rendimiento de componentes de la leche (proteína y rendimiento de grasa, g/d), eficiencia alimentaria (kg LCG/kg IMS) y la EUN (%). Todos los datos obtenidos de los estudios e incluidos en la base de datos, fueron estandarizados conforme a las mismas unidades de medición de la variable respectiva. Si no constaba la información, la ingesta de alimento o las variables de rendimiento de la producción fueron calculadas usando las siguientes ecuaciones:

$$\text{IN} = [\text{IMS} \times (\% \text{PB}/6,25)] \quad [1]$$

$$\% \text{ componente de leche} = (\text{rendimiento componente leche} / \text{rendimiento de leche}) \times 100 \quad [2]$$

$$\begin{aligned} \text{Rendimiento componente de la leche} = \\ (\% \text{ componente de la leche} \times \text{rendimiento de leche}/100) \end{aligned} \quad [3]$$

$$\text{LCG} = (0,35 \times \text{rendimiento de la leche}) + (18,57 \times \text{rendimiento de la grasa en la leche}) \quad [4]$$

$$\begin{aligned} \text{LCE} = (0,327 \times \text{rendimiento de leche}) + (12,95 \times \text{rendimiento de grasa en la leche}) \\ + (7,65 \times \text{rendimiento de proteína en la leche}) \end{aligned} \quad [5]$$

$$\text{EA} = \text{LCG}/\text{IMS} \quad [6]$$

$$\text{EUN} (\%) = [\text{rendimiento de la proteína de la leche}/6,25/\text{IN}] \times 100 \quad [7]$$

**Tabla 1. Descripción de estudios experimentales usados en el metaanálisis que examina el efecto de la suplementación con ULC sobre el rendimiento de las vacas lecheras.**

Referencia	País	Raza	Pauta de alimentación	Número de animales (control)	Número de animales (ULC)	Dosis de ULC % MS	Duración (días)
Abdel-Raouf et al. [21]	Egipto	Holstein	TMR (dieta basada en ensilado de maíz/maíz)	4	4	0, 0.26, 0.53	84
Agovino [22]	Italia	Holstein-Frisona	TMR (dieta basada en ensilado de maíz/heno de hierba)	155	155	0, 0.36	40
Akay et al. [23] (Trial 1)	USA	Holstein	TMR (dieta basada en ensilado de maíz/maíz)	103	103	0, 0.94	77
Akay et al. [23] (Trial 2)	USA	Holstein	TMR (dieta basada en ensilado de maíz/maíz)	120	120	0, 0.67	30
Gadegaonkar et al. [24]	India	Gir, Gir x Holstein, Gir x Jersey	Componentes ( Mezcla de heno, pasto verde,concentrado)	6	6	0, 1	180
Galo et al. [25]	USA	Holstein	TMR (dieta basada en ensilado de maíz/maíz)	8	8	0, 0.77	57
Giallongo et al. [26]	USA	Holstein	TMR (dieta basada en ensilado de maíz)	12	12	0, 0.40	112
Inostroza et al. [27]	USA	Holstein	TMR (dieta basada en ensilado de maíz, ensilado alfalfa)	2368	2368	0, 0.40	60
Miranda et al. [28]	Brasil	Holstein	TMR (dieta basada en ensilado de maíz)	8	8	0, 0.75	112
Neal et al. [29]	USA	Holstein	TMR (dieta basada en ensilado de maíz, ensilado alfalfa)	12	12	0, 0.49	112
Santiago et al. [30]	Brasil	Holstein x Zebu	TMR (dieta basada en ensilado de sorgo/maíz)	8	8	0, 1.12	60
Santos et al. [31]	Brasil	Holstein	TMR (dieta basada en ensilado de hierba/pulpa de cítrico)	18	18	0, 0.61	63
Sinclair et al. [32]	Reino Unido	Holstein-Friesian	TMR (dieta basada en ensilado de maíz/henolaje de hierba)	42	42	0, 0.55	105
Souza et al. [33]	Brasil	Holstein	TMR (dieta basada en ensilado de maíz/henolaje de hierba)	17	17	0, 0.40	30, 60
Stewart et al. [34]	USA	Holstein	TMR (dieta basada de ensilado de maíz)	6	6	0, 0.64	42
Tye et al. [35]	USA	Holstein	TMR (dieta basada en ensilado de maíz/heno de alfalfa)	8	8	0, 0.45, 0.46	84
Varga and Ishler [36]	USA	Holstein	TMR (dieta basada en ensilado de maíz)	60	60	0, 0.44	90

SRU: Slow-release urea; TMR: Total mixed ration.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0246922.t001>

La LCG es la leche ajustada al 3,5% de grasa y la LCE es la leche ajustada al 3,5% de grasa y al 3,0% de proteína verdadera. La IMS, el rendimiento de la leche, la LCG y la LCE fueron expresados como kg/d mientras que la IN fue expresada como g/d.

### La huella de carbono del alimento y la excreción de nitrógeno en el estiércol

La base de datos de las dietas fue creada a partir de las materias primas comunes usadas en las dietas control y ULC en todos los estudios seleccionados. La base de datos de las dietas estaba alimentada con valores para la huella de carbono (incluyendo cambios de uso de la tierra) de materias primas extraída del Dutch FeedPrint software, desarrollado por Wageningen University and Research, The Netherlands [37]. Se creó el software FeedPrint para explorar en profundidad las emisiones de gases de efecto invernadero (GEI) a lo largo de la cadena de producción y de utilización de los alimentos y para identificar alternativas de mitigación [37]. En casos excepcionales, cuando la huella de carbono (HC) de las materias primas no estaba incluida en el FeedPrint, se obtenía el dato de la HC del software Plurimix1 diet formulation (Fabermatica, Ostiano, Italy). La huella de carbono de las materias primas comunes en las raciones, incluidas en la base de datos de raciones, se presenta en la Tabla S2. La contribución de las materias primas de las raciones a su huella de carbono, fue calculada multiplicando el nivel de inclusión de la materia prima y la huella de carbono (HC) por kg de materia prima ( g CO<sub>2</sub> eq/kg).

La huella de carbono promedio de la ración fue calculada y expresada como g CO<sub>2</sub> eq/kg en la dieta. La HC del uso de los alimentos en la producción de leche fue calculada dividiendo la HC del la ración por la eficiencia alimentaria y el resultado fue expresado en g CO<sub>2</sub> eq/kg leche. Adicionalmente, la base de datos de los ingredientes fue usada para estimar los cambios relativos en el nivel de inclusión de materias primas comunes entre las dietas control y de ULC. Fueron usadas ecuaciones estáticas documentadas para calcular la excreción de N en el estiércol (Nex) y la intensidad de excreción de N (Nexi), basándose en los resultados de la ingesta de alimento y las variables de rendimiento de producción (IMS, IN, y rendimiento en leche) obtenidos del metaanálisis de las dietas control y de ULC. El Nex expresó la cantidad absoluta de N excretado por día (g/vaca/día) mientras que Nexi expresó la cantidad de N excretado por unidad de rendimiento de leche (g N/kg leche). Las ecuaciones referenciadas siguientes fueron usadas para calcular Nex, Kebreab et al. [38], Tomlinson et al. [39], Weiss et al. [40]:

$$\text{Nex} = 10 + (0,28 \times \text{IN}) + 20 + (0,38 \times \text{IN}); \quad [8]$$

$$\text{Nex} = 0,778 \times \text{IN} - (6,93 \times \text{IMS}) + 122,6; \quad [9]$$

$$\text{Nex} = 51 + (\text{IN} \times 0,64) - (0,94 \times \text{rendimiento de leche}); \quad [10]$$

### Análisis estadístico

El efecto de la suplementación con ULC en la ingesta de alimento y en los parámetros de rendimiento de producción, fueron sometidos a un análisis estadístico, usando un modelo lineal mixto. El efecto del tratamiento fue incluido como un efecto fijo, la duración del experimento como covariable, y el efecto del estudio fue incluido como un efecto aleatorio [17]. Se usó el número de animales como un factor de ponderación para el análisis [41,42]. Los resultados del efecto del tratamiento fueron presentados como medias de mínimos cuadrados para las dietas control y de ULC. Se consideró alcanzada la significación estadística del efecto del tratamiento cuando  $P < 0,05$ .

Asimismo, fueron realizados análisis de regresión para investigar la relación entre ingesta de alimento y rendimiento de producción, en respuesta al nivel de inclusión de ULC y el contenido de PB en la dieta. Cada ingesta de alimento y cada parámetro de rendimiento de producción, fueron tratados como una variable dependiente respectiva, mientras que el nivel de inclusión de ULC y el contenido de PB en la dieta fueron tratados como variables predictivas/independientes. Se usó el número de animales como factor de ponderación para los análisis de regresión. La precisión del modelo fue evaluada estimando el error residual como un error cuadrático medio (RMSE, por sus siglas en inglés) y una R<sup>2</sup> ajustada. Se informó sobre los coeficientes de intersección y de pendiente, y sobre sus errores estándar respectivos y sobre los niveles significativos.

El modelo lineal mixto y los análisis de regresión fueron realizados usando el software SPSS (IBM Statistics version 22). Se estudió la presencia de sesgo de publicación en los estudios usados para el metaanálisis, tanto gráficamente con graficas de embudo como estadísticamente con el test de Begg [43] usando el software Comprehensive Meta-analysis (version 3, Biostat Inc., USA). Se consideró alcanzada la significación estadística de sesgo de publicación evaluado con el test de Begg cuando  $P < 0,05$ .

## Resultados

### Composición de la dieta y características del estudio.

Como se muestra en la Tabla 1, las raciones totales mixtas (TMR) fueron el esquema alimentario predominante en 16 de los 17 estudios incluidos en este metaanálisis. La reformulación de las dietas lecheras con ULC concentra la fracción de N de la dieta, lo que crea espacio en la materia seca para incluir más fuentes de fibra y de energía. Siguiendo esta estrategia de reformulación de la dieta, la base de datos de alimentos desarrollada para este metaanálisis, indicó que los niveles promedio de inclusión de fuentes de proteína vegetal fueron relativamente bajos en las dietas con ULC (Tabla S3) mientras que los niveles de inclusión de fuentes de energía y de fibra aumentaron en las dietas con ULC (Tabla S4). En comparación con las dietas control, las dietas con ULC tenían una menor inclusión de fuentes de proteína vegetal, incluyendo la harina de soja (-20,8%), harina

Tabla 2. Estadística descriptiva de las variables de dieta, ingesta de pienso y de rendimiento productivo, extraídas de los estudios incluidos en el metaanálisis.

Elementos de estudio	n	Mean	Minimum	Maximum	SD
<i>Variables de la dieta</i>					
Nivel de inclusión de la ULC (% MS dieta)	22	0.58	0.26	1.12	0.23
Contenido de PB de la dieta (% MS)	44	17.16	11.82	23.74	2.67
<i>Ingesta de alimento</i>					
Ingesta de materia seca (IMS, kg/día)	44	22.92	10.33	29.90	4.12
Ingesta de nitrógeno (IN, g/d)	44	633.84	195.36	882.84	151.50
<i>Rendimiento</i>					
Rendimiento en leche (kg/d)	44	33.46	5.80	43.80	9.11
Leche corregida en grasa (LCG, kg/d)	44	33.80	5.99	44.43	8.84
Leche corregida por energía (LCE, kg/d)	44	34.24	6.27	45.10	8.93
Grasa de la leche (%)	44	3.59	2.71	4.51	0.37
Rendimiento de la grasa de la leche (kg/d)	44	1.19	0.21	1.59	0.31
Proteína de la leche (%)	44	3.12	2.79	3.86	0.21
Rendimiento de la proteína de la leche (kg/d)	44	1.03	0.21	1.40	0.27
<sup>3</sup> Eficiencia alimentaria	44	1.45	0.58	1.89	0.28
Eficiencia del uso del nitrógeno (%)	44	26.00	17.24	34.66	4.67

ULC (SRU): urea de liberación controlada; PB (CP): Proteína bruta; DE (SD): desviación estándar

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0246922.t002>

de cáñola/colza (-29,2%), henolaje de alfalfa (-32,7%), torta de semilla de algodón (-62,0%) y granos de maíz de destilería (-18,7% (Tabla S3). Esto fue acompañado de un aumento en fuentes de fibra y de energía en las dietas con ULC, principalmente productos de maíz (+9,5%), henolaje de hierba (+5,6%), pulpa de cítrico (+26,1%) y salvado de trigo (+119,9%).

El resumen estadístico de las variables de dieta, ingesta de alimento y rendimiento productivo incluido en el metaanálisis se presenta en la Tabla 2. El nivel promedio de inclusión de ULC en todas las dietas suplementadas con ULC fue 0,58% MS en la dieta. El contenido de PB en las dietas varió entre 11,8% y 23,7%. De manera similar, la IMS y la IN variaron en todas las dietas, con un valor promedio de 22,9 kg/día y 633,8 g/día, respectivamente. El rendimiento lechero, la leche corregida en grasa y la leche corregida por energía promediaron 32,16, 32,98, y 33,30 kg/día, respectivamente. Los promedios observados en los componentes de la leche fueron grasa de la leche (3,59%), rendimiento de la grasa de la leche (1,19 kg/d), proteína de la leche (3,12%) y rendimiento de la proteína de la leche (1,03 kg/día). Hubo grandes diferencias en la eficiencia alimentaria (0,58 a 1,89) y eficiencia del uso del nitrógeno (EUN) (17,2 a 34,7%) de las vacas usadas en estudios incluidos en el metaanálisis.

### Ingesta de alimento y rendimiento productivo

El efecto de suplementar ULC en el consumo de alimento y el rendimiento productivo de las vacas lecheras se presenta en la Tabla 3. Las dietas con ULC disminuyeron ( $P<0,05$ ) la IMS (-500g/d) y la IN (-20g/d). Sin embargo, la suplementación con ULC no influyó ( $P<0,05$ ) en el rendimiento lechero, la LCG, la LCE, la grasa de la leche ni en los porcentajes de proteína ni en los rendimientos de proteína y de grasa en la leche. La sustitución parcial de fuentes de proteína vegetal por ULC mejoraron significativamente la eficiencia alimentaria (+3%) y la EUN (+4%) de las vacas lecheras. La forma simétrica de las gráficas de embudo y los resultados del test de Begg indicaron que no hubo ningún sesgo de publicación en los estudios usados para la evaluación en el metaanálisis de la ingesta de alimento y las variables de rendimiento productivo (Figuras S1-S3).

La Tabla 4 muestra la relación existente entre la ingesta de alimento y el rendimiento productivo en respuesta al nivel de inclusión de ULC y el contenido de PB en la dieta. Los análisis de regresión revelaron que el aumento del nivel de inclusión de ULC redujo la IMS ( $P<0,001$ ,  $R^2 = 0,536$ ) y el IN ( $P<0,001$ ,  $R^2 = 0,761$ ), mientras que al aumentar el contenido de PB en la dieta se incrementaron ambos parámetros. El modelo demostró una baja correlación para predecir una relación de LCG,

**Tabla 3. Efecto de la suplementación con urea de liberación controlada sobre la ingesta de alimento y el rendimiento productivo de vacas lecheras.**

Item	Dieta		Error estándar de la media	P-value
	CON	SRU		
<i>Ingesta de alimento</i>				
Ingesta de materia seca (IMS, kg/día)	22.97	22.47	0.335	0.004
Ingesta de nitrógeno (IN, g/d)	625.57	605.67	12.865	0.009
<i>Rendimiento de producción</i>				
Rendimiento en leche (kg/d)	32.16	32.46	0.437	0.307
Leche corregida en grasa (LCG, kg/d)	32.98	33.16	0.412	0.381
Leche corregida por energía (LCE, kg/d)	33.30	33.52	0.402	0.284
Grasa de la leche (%)	3.67	3.66	0.023	0.681
Rendimiento de la grasa de la leche (kg/d)	1169.85	1173.84	14.653	0.655
Proteína de la leche (%)	3.14	3.15	0.025	0.931
Rendimiento de la proteína de la leche (kg/d)	998.01	1007.19	11.927	0.331
Eficiencia alimentaria	1.41	1.45	0.022	0.013
Eficiencia del uso del nitrógeno (%)	25.28	26.41	0.534	0.016

CON; tratamiento control; ULC (SRU): tratamiento con urea de liberación controlada; EE (SEM): error estándar de la media

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0246922.t003>

LCE, grasa de la leche y rendimiento de la proteína con las variables predictivas (nivel de ULC y contenido en la dieta de PB). Sin embargo, el aumento del nivel de inclusión de ULC y del contenido de PB en la dieta tuvo una relación positiva para aumentar el rendimiento lechero ( $P < 0.001$ ,  $R^2 = 0.307$ ) y la eficiencia alimentaria ( $P < 0.001$ ,  $R^2 = 0.427$ ). Además, la EUN ( $P < 0.001$ ,  $R^2 = 0.542$ ) aumentó con el nivel creciente de ULC mientras que el contenido de PB en la dieta tuvo una relación inversamente proporcional con la EUN.

R<sup>2</sup> ajustada

**Tabla 4. Regresión lineal de la relación de la ingesta de pienso y el rendimiento productivo en respuesta al nivel de inclusión de la urea de liberación controlada (ULC,% MS dieta)**

Parámetro de respuesta	<sup>1</sup> Estimaciones de parámetros									<sup>2</sup> Estimaciones del modelo		
	Intercept			SRU level			Nivel de PB de la dieta			RECM	R <sup>2</sup> ajustada	P-value
	a	EE	P-value	b	EE	P-value	b	EE	P-value			
<i>Ingesta de alimento</i>												
Ingesta de materia seca (IMS, kg/día)	21.23	0.445	< 0.001	-12.33	0.235	< 0.001	0.64	0.024	< 0.001	1.604	0.536	< 0.001
Ingesta de nitrógeno (IN, g/d)	-49.22	12.334	< 0.001	-343.92	6.516	< 0.001	54.83	0.670	< 0.001	44.440	0.761	< 0.001
<i>Rendimiento de producción</i>												
Rendimiento en leche (kg/d)	10.44	0.704	< 0.001	4.52	0.372	< 0.001	1.32	0.038	< 0.001	2.535	0.307	< 0.001
FCM (kg/d)	21.58	0.729	< 0.001	3.67	0.385	< 0.001	0.79	0.040	< 0.001	2.626	0.138	< 0.001
ECM, kg/d)	23.94	0.716	< 0.001	3.50	0.378	< 0.001	0.659	0.039	< 0.001	2.579	0.109	< 0.001
Grasa de la leche (%)	5.510	0.037	< 0.001	-0.14	0.019	< 0.001	-0.10	0.002	< 0.001	0.133	0.447	< 0.001
Rendimiento de la grasa de la leche (kg/d)	965.07	27.19	< 0.001	112.43	14.364	< 0.001	17.59	1.476	< 0.001	97.970	0.062	< 0.001
Proteína de la leche (%)	5.469	0.034	< 0.001	-0.14	0.018	< 0.001	-0.13	0.002	< 0.001	0.121	0.643	< 0.001
Rendimiento de la proteína de la leche (kg/d)	1050.35	22.276	< 0.001	74.02	11.768	< 0.001	0.05	1.209	0.965	80.26	0.012	< 0.001
Eficiencia alimentaria	0.959	0.033	< 0.001	0.83	0.017	< 0.001	0.003	0.002	0.062	0.119	0.427	< 0.001
Eficiencia del uso del nitrógeno (%)	54.70	0.746	< 0.001	11.70	0.394	< 0.001	-2.082	0.041	< 0.001	2.688	0.542	< 0.001

<sup>1</sup>Estimaciones de parámetros: a: constante de intersección; b: coeficiente de pendiente; EE (SE): error estándar.

<sup>2</sup>Estimaciones del modelo: RECM (RMSE): raíz del error cuadrático medio; Adj-R<sup>2</sup> : R<sup>2</sup> ajustada.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0246922.t004>



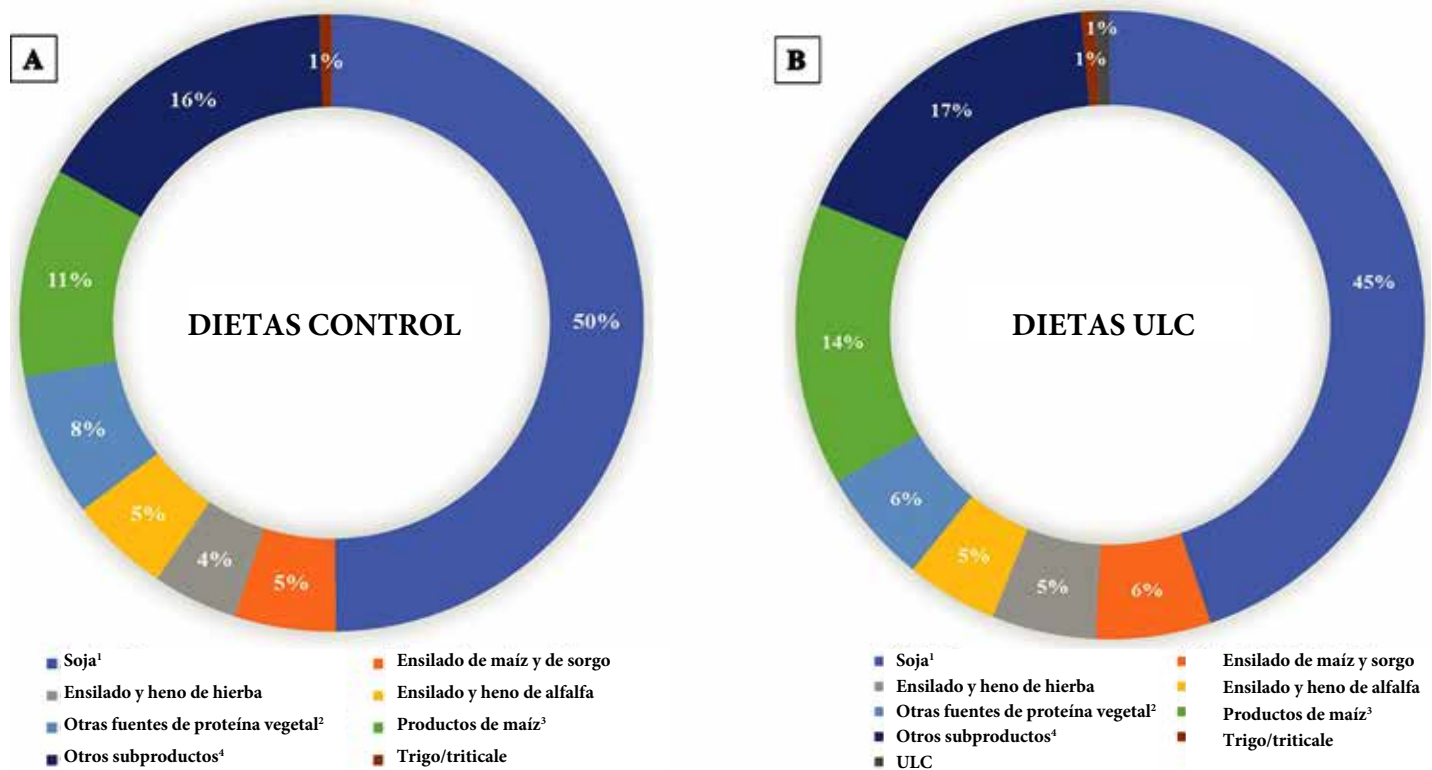


Figura 2. Contribución de las materias primas de uso más frecuente en las raciones a la huella de carbono promedio de (A) las dietas control y (B) las dietas con urea de liberación controlada (ULC). <sup>1</sup>Soja incluye harina de soja, soja tostada, semillas de soja calentadas y soja bypass. <sup>2</sup>Otras fuentes de proteína vegetal incluyen harina de cáñola, harina de colza, maíz y granos de trigo de destilería, harina de lino, torta de semilla de algodón y harina de gluten de maíz. <sup>3</sup>Los productos de maíz incluyen: maíz molido, maíz de alta humedad, maíz hojueado al vapor y harina de maíz. <sup>4</sup>Otros subproductos incluyen: pulpa de remolacha de azúcar, paja de trigo, pulpa de cítrico, salvado de trigo, salvado de arroz, granos de destilería, harinilla de trigo, cáscaras de semilla de algodón, cascarilla de soja

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0246922.g002>

### La sostenibilidad de la producción de leche

El impacto de suministrar ULC sobre la sostenibilidad de la producción lechera fue estudiado midiendo la huella de carbono de las raciones (Figuras 2 y 3) y la excreción de N en el estiércol (Tabla 5). Los resultados revelaron que los productos de soja fueron los principales causantes de la huella de carbono en las dietas lecheras, representando 50% y 45% de la huella total de carbono de las dietas control y ULC, respectivamente (Fig. 2). Los productos y subproductos de maíz representaron más del 10% de la huella de carbono del alimento en ambas dietas, la de control y la de ULC. En particular, la inclusión de ULC en las dietas contribuyó únicamente en un 1% a la huella de carbono de la dieta (Fig.2) La sustitución parcial de fuentes de proteína vegetal por ULC disminuyó la huella de carbono de las dietas con ULC suplementada (-12%; 461.50 vs. 524.62 g CO<sub>2</sub> eq/kg dieta) en comparación con las dietas control (Fig. 3A). Del mismo modo, la huella de carbono del uso del alimento en la producción de leche, fue menor en el caso de las dietas suplementadas con ULC que en las dietas control (-14.5%; 319.15 vs. 373.13 g CO<sub>2</sub> eq/kg leche) (Fig 3B). La Tabla 5 describe el efecto de la suplementación con ULC sobre el nitrógeno excretado en el estiércol (Nex) y sobre la intensidad de la excreción de nitrógeno (Nexi). Los cálculos de las ecuaciones demostraron que la suplementación con ULC disminuyó Nex en 2,7% hasta un 3,1% (-12 a -13 g/vaca/d). Asimismo, los cálculos de las ecuaciones indicaron que la suplementación con ULC redujo la cantidad de N excretado por unidad de leche (Nexi) en un 3,6% hasta un 4% (-0.50 a -0.53 g N/kg leche).

### Discusión

Hace tiempo que se ha reconocido que maximizar la síntesis de PBM es importante y que una carencia de PDR podría comprometer el nivel de amoníaco ruminal requerido para optimizar la síntesis de PBM, con el resultado de una disminución de la digestibilidad de la fibra, la IMS y la producción de leche [44]. El producto patentado de ULC ( Optigen® ), evaluado en este estudio,

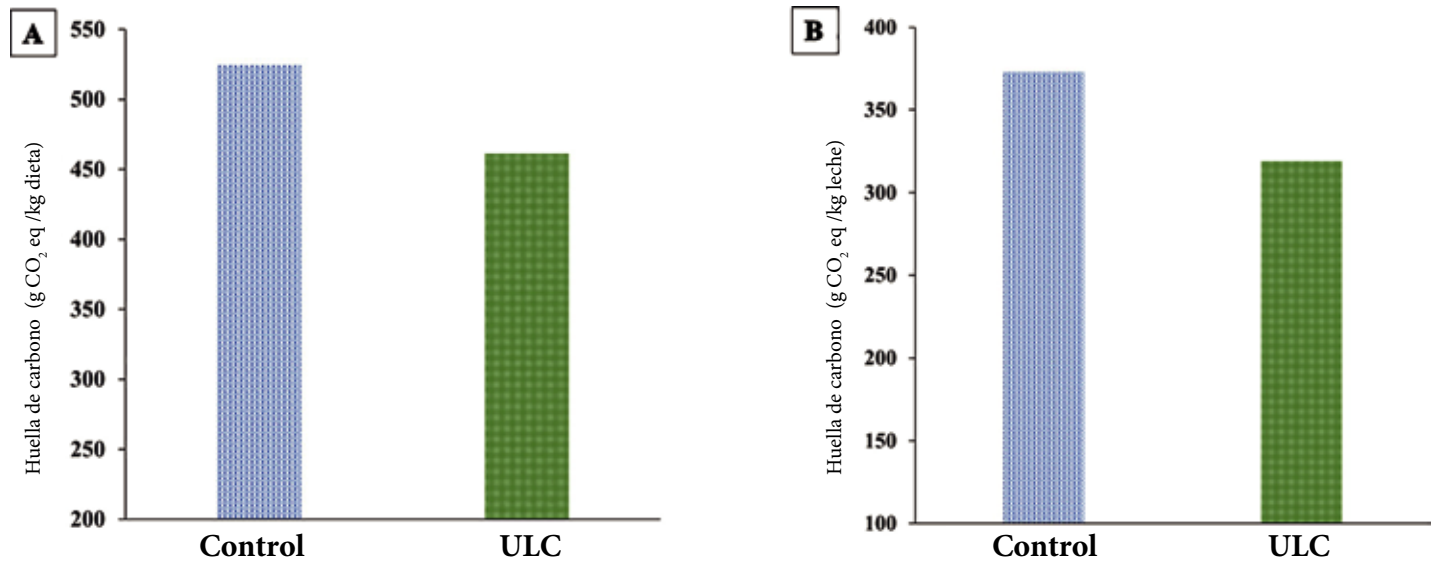


Fig. 3. Efecto de la reformulación de dietas para ganado lechero con urea de liberación controlada, sobre (A) la huella de carbono promedio (HC) de las dietas para ganado lechero y (B) la huella de carbono (HC) promedio del del alimento usado en la producción de leche.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0246922.g003>

permite la reformulación de las dietas lecheras con una menor inclusión de fuentes de proteína vegetal de PDR. Nuestra hipótesis es que proporciona una disponibilidad más sostenida de amoníaco en el rumen. Se espera que optimice la sincronización de la producción ruminal de NH<sup>3</sup> con la obtención de energía de la digestión para mejorar la síntesis de PBM. En un ensayo *in situ* realizado en animales canulados, Akay et al. [23] demostraron que la desaparición del N de la ULC era más similar a la de la harina de soja y más lenta que en la de la urea destinada a alimentación. Los autores posteriormente utilizaron un fermentador continuo de cultivos que simulaba el rumen de vacas lecheras Holstein para demostrar que una dieta suplementada con ULC en 0,66 % MS aumentaba la síntesis de proteína bacteriana y el aprovechamiento de nutrientes, que indican una digestión mejorada de los mismos. Estos datos indicaron que la ULC podría ser una fuente de liberación controlada viable de NNP en la nutrición ruminal.

Tabla 5. La excreción de nitrógeno en el estiércol (Nex) y la intensidad de excreción de nitrógeno (Nexi), calculadas basándose en los resultados de la ingesta de alimento y en las variables de rendimiento de producción IMS, (kg/vaca); IN, (g/d); y rendimiento en leche, (kg/d), obtenidos del metaanálisis.

Parámetros	Dieta		Diferencia	Cambio %
	CON	SRU		
<i>Excreción de nitrógeno (Nex, g/vaca/d)</i>				
<sup>1</sup> IN	442.88	429.74	-13.13	-2.97
<sup>2</sup> IN + IMS	450.11	438.09	-12.02	-2.67
<sup>3</sup> IN + RL	421.13	408.12	-13.02	-3.09
<i><sup>4</sup>Intensidad de la excreción de nitrógeno (Nexi, g N/kg leche)</i>				
IN	13.77	13.24	-0.53	-3.86
IN + IMS	14.00	13.50	-0.50	-3.57
IN + RL	13.09	12.57	-0.52	-3.99

IMS (DMI): ingesta de materia seca; IN (NI): ingesta de nitrógeno; RL (MY): rendimiento en leche; CON: tratamiento control; ULC (SRU): tratamiento con urea de liberación controlada.

<sup>1</sup>Nex = 10 + (0.28<sup>ff</sup>NI) + 20 + (0.38<sup>ff</sup>NI); Kebreab et al. [38].

<sup>2</sup>Nex = 0.778<sup>ff</sup>NI - (6.93<sup>ff</sup>DMI) + 122.6; Tomlinson et al. [39].

<sup>3</sup>Nex = 51 + (NI<sup>ff</sup>0.64) - (0.94<sup>ff</sup>MY); Weiss et al. [40].

<sup>4</sup>Nexi = Nex/MY.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0246922.t005>

En las dos últimas décadas, se ha realizado una amplia investigación sobre la aplicación de ULC (Optigen®) en la ración de rumiantes, incluyendo las vacas lecheras. La ULC contiene un 41% de nitrógeno, que suministra un contenido de PB equivalente a 256%. Concentra la fracción de nitrógeno de la dieta y permite la reformulación de dietas con un menor nivel de inclusión de fuentes de proteína vegetal, como la harina de soja (PB, 40-48%) [18]. La reformulación de fuentes de proteína podría influir en el coste de los piensos, en la EUN y en la huella del carbono del pienso [7, 10]. En la práctica, la formulación de dietas con ULC concentra la fracción de N de la dieta y crea espacio en la materia seca para la inclusión de más fuentes de fibra y de energía. Por lo tanto, la reformulación de dietas con ULC puede traducirse en cambios significativos en la composición con materias primas de las dietas lecheras.

En este contexto, se creó una base de datos de ingredientes, a partir de la composición dietética usada en todos los estudios incluidos en este metaanálisis. Varios cambios en las composiciones de ingredientes fueron observados entre las dietas control y las de ULC, que reflejan el hecho de que la estrategia de reformulación de dietas depende de la variación de la disponibilidad local de materias primas para alimentación. Los presentes resultados demostraron que los productos de soja y de harina de cáñola/colza, alfalfa, torta de semilla de algodón y granos de maíz de destilería fueron las principales fuentes de proteína vegetal parcialmente reemplazadas por la ULC. Sobre todo, la harina de soja fue la fuente de PDR más usada y las estrategias que podrían reducir su nivel de inclusión son atractivas, debido a su precio en un mercado volátil y a su potencialmente elevada huella de carbono asociada a cambios en el uso de la tierra. El uso reducido de la harina de soja y de otros ingredientes anteriormente mencionados, permitieron una mayor inclusión de productos de maíz, de subproductos en los piensos (pulpa de remolacha de azúcar, pulpa de cítricos y el salvado de trigo) y heno de hierba. Los productos de maíz son la principal fuente de energía en la mayoría de las dietas reformuladas con ULC, y esto podría obedecer al objetivo de proporcionar energía más fermentable, que podría optimizar la sincronización con el NH<sub>3</sub> para reforzar el rendimiento de la PBM y una mayor producción de leche. Efectivamente, los cambios observados en la composición de las dietas experimentales fueron coherentes con la estrategia de reformulación de dietas que se aplicó en la práctica.

Una multitud de estudios han utilizado el metaanálisis para proporcionar evidencia cuantitativa, basada en la investigación, sobre la eficacia de productos nutricionales o las intervenciones en vacas lecheras [45-47]. Por lo que sabemos, este es el primer estudio de un metaanálisis en examinar el efecto de la suplementación con ULC sobre el rendimiento productivo de las vacas lecheras. Al suministrar ULC en las dietas disminuyó la IMS, lo que explica en gran parte la reducción de la IN. La disminución de la IN fue también causada por un contenido ligeramente más bajo de PB en las dietas suplementadas con ULC en comparación con las dietas control (16,60 vs 16,75). Los análisis de regresión indicaron que aumentando el nivel de inclusión de ULC se redujo la IN. Se ha demostrado que una menor IMS puede reducir la ingesta de nutrientes y disminuir la producción de leche en las vacas lecheras [48,49]. En contraposición a esta expectativa, al suplementar con ULC disminuyó la IMS sin tener una influencia negativa ni en el rendimiento lechero ni en la composición de la leche. Una explicación plausible para esta observación es que la ULC suplementada, consiguió una liberación más sostenida de NH<sub>3</sub>, lo que permitió una mejor sincronización con la obtención de energía fermentable, y optimizó el crecimiento bacteriano ruminal y la digestión microbiana. Este efecto podría tener como resultado que un mayor suministro de nutrientes sea utilizado para la producción de leche. Y por otra parte, la eficiencia alimentaria es una medición significativa en las vacas lecheras, teniendo en cuenta su vínculo con la rentabilidad y los impactos medioambientales de la producción lechera [50]. Los presentes resultados revelaron que la suplementación de las dietas con ULC mejoró la eficiencia alimentaria de las vacas lecheras en un 3%.

Esta mejora de la eficiencia alimentaria fue causada por una menor IMS y por un ligero aumento del rendimiento en leche. Descubrimientos más recientes han confirmado que las estrategias de nutrición y de mejora genética, podrían desempeñar funciones decisivas en la producción de animales más eficientes, que requieran menos alimento para mantener el mismo nivel de producción de leche [51,52]. Esto es coherente con la presente indicación de que la ULC mejoró la eficiencia alimentaria de las vacas lecheras reduciendo la IMS, sin comprometer el rendimiento de la leche. En este sentido, las discrepancias en eficiencia alimentaria se pueden atribuir a los mecanismos fisiológicos y bioquímicos asociados a la digestión, a la captura de energía y a su aprovechamiento [52]. Además, el efecto de la ULC de reforzar la captura de nitrógeno en el rumen y la mejor eficiencia alimentaria podrían relacionarse con una modulación en el microbioma ruminal promovida por la suplementación con urea [53,54]. Li et al. [54] descubrieron que la abundancia en el rumen de *Howardella spp.* y de *Desulfobulbus spp.* creció como respuesta a

un incremento del N de la dieta asociado con el suministro de urea, lo que sugiere que la suplementación con urea podría afectar la capacidad ureolítica y reductora del azufre de la comunidad bacteriana ruminal. Waghorn and Dewhurst [55] concluyeron que las diferencias en eficiencia alimentaria pueden estar asociadas con variaciones en la función del rumen, incluyendo la duración y la extensión de la digestión ruminal, lo que influye en los productos de la fermentación (ácidos grasos volátiles y PBM) proporcionando nutrientes al animal. En conformidad con estas aseveraciones, se ha demostrado que la ULC en la dieta mejora potencialmente la síntesis de PBM y la digestión ruminal [23], lo que podría explicar la mayor eficiencia alimentaria observada en las vacas alimentadas con dietas suplementadas con ULC. Esto es compatible con una relación directa entre la eficiencia alimentaria y el nivel de inclusión de ULC, como han indicado los análisis de regresión.

La EUN está calculada como rendimiento de N en la leche sobre el porcentaje de la IN total. En efecto, el rendimiento del N en la leche es una función del rendimiento de la leche y del contenido de N en la leche. Las estrategias que mejoran la EUN son cruciales para reducir la excreción del N y los impactos medioambientales de la producción de los rumiantes [56–58]. Al igual que otras especies de rumiantes, las vacas lecheras tienen una EUN relativamente baja, comunicada en un 25% como promedio, con una amplia variación (21 a 42%) entre experimentos [59]. En este estudio, la EUN varió entre 17,2 y 34,7% con un valor promedio de 26%, similar a lo publicado por Whelan et al. [59]. Los presentes resultados demostraron que la ULC mejoró significativamente la EUN en un 4%. La mejora de la EUN observada en este estudio fue generada principalmente por un descenso de la IN de la dieta, sin afectar negativamente ni al rendimiento de la leche ni al contenido en proteína de la leche. De acuerdo con nuestra observación, Huhtanen y Hristov [47] comunicaron que el descenso de la IN es el factor más significativo para incrementar la EUN, con un efecto sobre la EUN considerablemente mayor, en comparación con estrategias que aumentan el rendimiento de la leche. Se espera que el efecto de la ULC en la mejora de la EUN reduzca la excreción de N en las vacas lecheras [47]. El efecto positivo de la ULC sobre la mejora de la captura de N en el rumen, podría explicar la mejor utilización del N para la producción de leche, generando una mayor eficiencia de uso del nitrógeno. Además, los análisis de regresión confirmaron que la suplementación con ULC tuvo una relación directa con el rendimiento de la leche y con la EUN.

Las crecientes preocupaciones del sector lechero se han centrado en los impactos medioambientales, debido al crecimiento de la demanda de productos lácteos, acompañado de un aumento de las emisiones de GEI y de N. Los principales aportaciones asociadas a las emisiones de GEI son de la energía primaria (p.ej., la electricidad y el combustible) y de los alimentos (el cultivo, el procesamiento y el transporte). La principal producción de GEI corresponde al metano de la fermentación entérica y al manejo del estiércol, y al N<sub>2</sub>O proveniente de la reducción del nitrato del estiércol del suelo. El presente estudio se centró en el cálculo de la huella de carbono y la excreción de N en el estiércol, como mediciones en la métrica de sostenibilidad de la producción lechera. Las emisiones correspondientes a la alimentación son responsables de aproximadamente un 36% de las emisiones de GEI de la producción lechera [8]. En el presente estudio, los productos de soja eran los que más aportaban a la huella de carbono de las dietas del ganado lechero, representando casi la mitad de la huella de carbono de la dieta. Esto sugiere que los impactos medioambientales de las raciones del ganado lechero pueden reducirse considerablemente, reemplazando los productos de soja por ingredientes alternativos de proteína con baja huella de carbono, o por soluciones nutricionales como la ULC. Alimentar a base de dietas suplementadas con ULC en este estudio, redujo la huella de carbono de la ración en un 12%, y en un 14,5% la huella de carbono del uso del alimento para la producción de leche. Es interesante observar que la huella de carbono del uso de alimento para la producción de leche (319–373 CO<sub>2</sub> eq/kg leche) encontrado en este estudio, fue similar al rango de valores de la huella de carbono (180–340 CO<sub>2</sub> eq/kg leche) descrito para dietas formuladas para sistemas convencionales de producción lechera en Europa del Norte y América. [10]. Este desenlace es interesante teniendo en cuenta que la huella de carbono del alimento en este estudio provino principalmente de experimentos realizados en América. Wilkinson y Garnsworthy [10] demostraron que existe una oportunidad para formular dietas con una baja huella de carbono, para reducir la huella del uso del alimento en la producción de leche hasta un 40% (de 239 a 142 CO<sub>2</sub> eq/kg leche). Esto se puede lograr formulando la dieta con ensilado de hierba y una alta proporción de ingredientes coproducidos, con una baja huella de carbono [10,60].

En el presente estudio, la reducción de la huella de carbono se puede atribuir, en gran medida, a la sustitución parcial de productos de soja por ULC. Cabe señalar que los productos de soja fueron responsables de un 50% de la huella de carbono de las dietas control mientras que las dietas suplementadas con ULC representaron un 45% de la huella de carbono. De acuerdo con nuestros resultados, el uso de ULC como sustitución parcial de la harina de soja y de la harina de semilla de algodón redujo la huella de carbono de las dietas para ovejas [12] y búfalas de leche [11]. Basándose en la reducción de la huella de carbono del alimento observada en este estudio, se puede estimar que el uso de la ULC en la dieta de 1000 vacas (rendimiento lechero = 40 kg/vaca/día; producción anual de leche = 12.200 toneladas/año) podría reducir la huella anual de carbono de la producción en 646, 81 toneladas CO<sub>2</sub> eq/año. En una perspectiva más amplia, este ahorro en carbono es equivalente a retirar 424 coches de la circulación en el Reino Unido, al abastecimiento eléctrico habitual de 436 casas en el Reino Unido, o a 1348 vuelos transatlánticos, en trayecto único de Londres a Nueva York, por pasajero individual.

Las dietas animales ejercen una influencia decisiva sobre la producción de metano entérico en rumiantes [61]. El metano es un potente GEI, responsable de una cuota importante de la huella de carbono global de la producción de leche [9]. Por lo tanto, es importante tener en cuenta que la ULC suplementada para reducir la huella de carbono del alimento, no resulta contrarrestada por un aumento de las emisiones de metano entérico, que podrían restar cualquier beneficio potencial sobre los impactos medioambientales de la producción de leche. En particular, existe escasa información publicada sobre el efecto de la suplementación con urea sobre la producción de metano entérico. Alipour et al. [62] y Rebelo et al. [63] demostraron que alimentando con otra forma de ULC (urea recubierta con una mezcla de aceites vegetales y polímeros) y urea destinada a piensos (no recubierta) no afectó al volumen producido de metano entérico, medido en un sistema de fermentación ruminal *in vitro* o en ganado vacuno de carne. Además, el uso de un método de evaluación del ciclo de vida indicó que la sustitución parcial de harina de soja y de harina de semilla de algodón por ULC (Optigen®) no afectó a la emisión de metano entérico de ovejas y de búfalas de leche [11,12]. Aunque información existente sugiera que la ULC en la dieta podría tener algún o ningún efecto sobre la emisión de metano entérico, existe una necesidad crucial de contar con estudios en el futuro, que evalúen el impacto de alimentar con ULC sobre el metano entérico, en virtud de diferentes pautas dietéticas para prevenir intercambios con el medio ambiente en la producción de los rumiantes.

Por otra parte, minimizar las pérdidas de N en el estiércol es un objetivo esencial para lograr el manejo de N sostenible en los sistemas de producción lechera. Las estrategias que optimizan la EUN han sido identificadas como un enfoque crucial, para reducir el Nex y los problemas de emisión de nitrógeno en las explotaciones agropecuarias [58]. Esto podría explicar por qué el efecto positivo de la suplementación con ULC sobre la mejora de la EUN es compatible con la reducción del N excretado en el estiércol, calculado a partir de las tres ecuaciones estáticas. Basándose en la reducción observada del Nex, se puede estimar que la suplementación con ULC de 1000 vacas lecheras podría reducir la excreción anual de N en 4.387,3 hasta 4.792,5 kg N/año. Se espera que la reducción de la excreción de N disminuya la volatilización del NH<sub>3</sub>, las pérdidas de N<sub>2</sub>O y la lixiviación de los nitratos del estiércol en los establos, en las instalaciones para almacenar abonos y en los campos de cultivos [6]. Esto coincide con la reducción de las emisiones descritas de N<sub>2</sub>O cuando la harina de semilla de algodón fue parcialmente sustituida por ULC en la búfala de leche [11].

## Conclusiones

El metaanálisis demostró que una inclusión promedio de ULC a 0,58% MS en la dieta, sustituyó parcialmente las fuentes de proteína vegetal en las dietas lecheras, consiguiendo como resultado una eficiencia alimentaria y una EUN mejoradas. Además, la suplementación mejoró la métrica de la sostenibilidad de la producción de leche, reduciendo la huella de carbono correspondiente al alimento en la producción de leche (-54 CO<sub>2</sub> eq/kg leche) y la excreción del N en el estiércol (-12 a -13 g/vaca/d). Estos resultados indican que las dietas lecheras pueden ser reformuladas con ULC, para reemplazar las fuentes de proteína vegetal, como la harina de soja, al tiempo que aumentan las fuentes de energía como el maíz. El incremento de la producción de leche observado en este estudio redujo los impactos de la producción de leche en el medio ambiente. Se precisa un trabajo adicional sobre la modelización de toda la explotación agropecuaria para investigar los impactos del uso de ULC en diferentes escenarios dietéticos, que abarquen la sostenibilidad de la producción de leche, desde el nacimiento hasta la salida de la explotación.

## Información complementaria:

**Fig. S1 . Las gráficas de embudo con diferencias medias brutas ( diferencia de medias) frente a sus errores estándar inversos y la significación asociada (valor p del test de Begg) para comprobar si hay sesgo de publicación de los estudios incluidos en el metaanálisis para la evaluación de la ingesta de materia seca, el rendimiento en leche y la leche corregida en grasa. Los círculos abiertos representan comparaciones de estudios individuales incluidos en el metaanálisis.**

(TIF)

**Fig. S2. Las gráficas de embudo de diferencias medias brutas ( diferencia de medias) frente a sus errores estándar inversos y la significación asociada ( valor p del test de Begg) para comprobar si hay sesgo de publicación de estudios incluidos en el metaanálisis para la evaluación de leche corregida por energía, grasa de la leche, rendimiento de la grasa de la leche y la proteína de la leche. Los círculos abiertos representan comparaciones de estudios individuales incluidos en el metaanálisis.**

(TIF)

**Fig. S3. Las gráficas de embudo de las diferencias medias brutas (diferencia de medias) frente a sus errores estándar inversos y la significación asociada (valor p del test de Begg) para comprobar si hay sesgo de publicación de estudios incluidos en el metaanálisis para la evaluación del rendimiento de la proteína de la leche, la eficiencia alimentaria y la eficiencia de uso del nitrógeno. Los círculo abiertos representan comparaciones de estudios individuales incluidos en el metaanálisis.**

(TIF)

**Tabla S1. Lista de verificación de PRISMA**

(DOC)

**Tabla S2. La huella de carbono (incluyendo los cambios de uso de tierra) de las materias primas comunes en las raciones usadas en estudios incluidos en el metaanálisis.**

(DOCX)

**Tabla S3. Efecto de la reformulación de la dieta con urea de liberación controlada (ULC) sobre los niveles promedio de inclusión de fuentes de proteína vegetal en las dietas, en estudios usados en el metaanálisis.**

(DOCX)

**Tabla S4. Efecto de la reformulación de la dieta con urea de liberación controlada (ULC) sobre los niveles promedio de inclusión de fuentes de energía vegetal , en los estudios usados en el metaanálisis.**

(DOCX)

## Author Contributions

**Conceptualization:** Saheed A. Salami, Helen E. Warren, Jules Taylor-Pickard.

**Data curation:** Saheed A. Salami.

**Formal analysis:** Saheed A. Salami.

**Funding acquisition:** Jules Taylor-Pickard.

**Investigation:** Saheed A. Salami.

**Methodology:** Saheed A. Salami.

**Project administration:** Saheed A. Salami, Colm A. Moran, Helen E. Warren, Jules Taylor-Pickard.

**Software:** Saheed A. Salami.

**Supervision:** Colm A. Moran, Helen E. Warren, Jules Taylor-Pickard.

**Visualization:** Saheed A. Salami.

**Writing – original draft:** Saheed A. Salami.

**Writing – review & editing:** Saheed A. Salami, Colm A. Moran, Helen E. Warren, Jules Taylor-Pickard.

## References

1. Calsamiglia S, Ferret A, Reynolds C, Kristensen NB, Van Vuuren A. Strategies for optimizing nitrogen use by ruminants. *Animal*. 2010; 4(7):1184–96. <https://doi.org/10.1017/S1751731110000911> PMID: 22444616
2. Schwab CG, Broderick GA. A 100-Year Review: Protein and amino acid nutrition in dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 2017; 100(12):10094–112. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13320> PMID: 29153157
3. Owens F, Qi S, Sapienza D. Invited Review: Applied protein nutrition of ruminants—Current status and future directions. *The Professional Animal Scientist*. 2014; 30(2):150–79.
4. Kertz A. Urea feeding to dairy cattle: A historical perspective and review. *The Professional Animal Scientist*. 2010; 26(3):257–72.
5. Cherdthong A, Wanapat M. Development of urea products as rumen slow-release feed for ruminant production: a review. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*. 2010; 4(8):2232–41.
6. Wattiaux M, Uddin M, Letelier P, Jackson R, Larson R. Invited Review: Emission and mitigation of greenhouse gases from dairy farms: The cow, the manure, and the field. *Applied Animal Science*. 2019; 35(2):238–54.
7. Wilkinson J, Garnsworthy P. Impact of diet and fertility on greenhouse gas emissions and nitrogen efficiency of milk production. *Livestock*. 2017; 22(3):140–4.
8. Gerber PJ, Steinfeld H, Henderson B, Mottet A, Opio C, Dijkman J, Falcucci A, et al. Tackling climate change through livestock: a global assessment of emissions and mitigation opportunities: Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Rome, Italy; 2013.
9. Gerber P, Vellinga T, Opio C, Henderson B, Steinfeld H. Greenhouse gas emissions from the dairy sector. A Life Cycle Assessment Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Rome, Italy. 2010.
10. Wilkinson J, Garnsworthy P. Dietary options to reduce the environmental impact of milk production. *The Journal of Agricultural Science*. 2017; 155(2):334–47.
11. Reddy PRK, Kumar DS, Rao ER, Seshiah CV, Sateesh K, Rao KA, et al. Environmental sustainability assessment of tropical dairy buffalo farming vis-a-vis sustainable feed replacement strategy. *Scientific Reports*. 2019; 9(1):1–16. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37186-2> PMID: 30626917
12. Reddy PRK, Kumar DS, Rao ER, Seshiah CV, Sateesh K, Reddy YPK, et al. Assessment of eco-sustainability vis-à-vis zoo-technical attributes of soybean meal (SBM) replacement with varying levels of coated urea in Nellore sheep (*Ovis aries*). *PLOS ONE*. 2019; 14(8).
13. Flachowsky G, Lebzien P. Possibilities for reduction of nitrogen (N) excretion from ruminants and the need for further research—a review. *Landbauforschung Volkenrode*. 2006; 56(1–2):19–30.
14. Powell JM. Feed and manure use in low-N-input and high-N-input dairy cattle production systems. *Environmental Research Letters*. 2014; 9(11):115004.
15. Oenema O. Nitrogen budgets and losses in livestock systems. *International Congress Series*. 2006; 1293:262–71.
16. Sauviant D, Schmidely P, Daudin J-J, St-Pierre NR. Meta-analyses of experimental data in animal nutrition?. *Animal*. 2008; 2(8):1203–14. <https://doi.org/10.1017/S1751731108002280> PMID: 22443733
17. St-Pierre N. Invited review: Integrating quantitative findings from multiple studies using mixed model methodology. *Journal of Dairy Science*. 2001; 84(4):741–55. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(01\)74530-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(01)74530-4) PMID: 11352149

18. Salami SA, Moran CA, Warren HE, Taylor-Pickard J. A Meta-Analysis of the Effects of Slow-Release Urea Supplementation on the Performance of Beef Cattle. *Animals*. 2020; 10(4):657. <https://doi.org/10.3390/ani10040657> PMID: 32290182
19. Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. *Annals of Internal Medicine*. 2009; 151(4):264–9. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-151-4-200908180-00135> PMID: 19622511
20. Garcia-Gonzalez R, Tricarico J, Harrison G, Meyer M, McLeod K, Harmon D, et al. Optigen® is a sustained release source of non-protein nitrogen in the rumen. *Journal of Animal Science*. 2007; 85:98.
21. Abdel-Raouf E, Bassiouni M, Ali M, Hassanien H. Effect of Using Slow-Release Urea on Milk Production and its Composition of Lactating Dairy Cows. *Journal of Sustainable Agriculture Science*. 2017; 43:17–26.
22. Agovino M. Optigen in diets for lactating dairy cows: milk composition and production in an Italian commercial herd. In Scientific poster presented at the 25th Alltech Symposium, Lexington, KY, USA, 17–20 May; Alltech Inc: Nicholasville, KY, USA. 2009. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2009.08.007> PMID: 19703582
23. Akay V, Tikofsky J, Holtz C, Dawson K. Optigen® 1200: Controlled release of non-protein nitrogen in the rumen. In Proceedings of the 20th Alltech Symposium; Lexington, USA, 23–24 May; Alltech Inc: Nicholasville, KY, USA. 2004:pp. 179–85.
24. Gadegaonkar G, Patil M, Gulvane S, Karambele N, Jagadale S. Effect of Supplementation of Slow Release Non-Protein Nitrogen Compound on the Lactation of Cows. *The Indian Journal of Veterinary Sciences and Biotechnology*. 2018; 14(3):24–7.
25. Galo E, Emanuele S, Sniffen C, White J, Knapp J. Effects of a polymer-coated urea product on nitrogen metabolism in lactating Holstein dairy cattle. *Journal of Dairy Science*. 2003; 86(6):2154–62. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73805-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73805-3) PMID: 12836952
26. Giallongo F, Hristov AN, Oh J, Frederick T, Weeks H, Werner J, et al. Effects of slow-release urea and rumen-protected methionine and histidine on performance of dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 2015; 98(5):3292–308. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8791> PMID: 25726096
27. Inostroza J, Shaver R, Cabrera V, Tricárico J. Effect of diets containing a controlled-release urea product on milk yield, milk composition, and milk component yields in commercial Wisconsin dairy herds and economic implications. *The Professional Animal Scientist*. 2010; 26(2):175–80.
28. Miranda MS, Arcaro JRP, Netto AS, Silva SdL, Pinheiro MdG, Leme PR. Effects of partial replacement of soybean meal with other protein sources in diets of lactating cows. *Animal*. 2019; 13(7):1403–11. <https://doi.org/10.1017/S1751731118002926> PMID: 30415645
29. Neal K, Eun J-S, Young A, Mjoun K, Hall J. Feeding protein supplements in alfalfa hay-based lactation diets improves nutrient utilization, lactational performance, and feed efficiency of dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 2014; 97(12):7716–28. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8033> PMID: 25262186
30. Santiago BT, Villela SDJ, Leonel FdP, Zervoudakis JT, Araújo RP, Machado HVN, et al. Slow-release urea in diets for lactating crossbred cows. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 2015; 44(5):193–9.
31. Santos J, Pereira M, Dias-Junior G, Bitencourt L, Lopes N, Junior S, et al. Response of lactating cows to partial replacement of soybean by optigen or urea. In Scientific poster presented at the 25th Alltech Symposium, Lexington, USA, 17–20 May; Alltech Inc: Nicholasville, KY, USA. 2009.
32. Sinclair L, Blake C, Griffin P, Jones G. The partial replacement of soyabean meal and rapeseed meal with feed grade urea or a slow-release urea and its effect on the performance, metabolism and digestibility in dairy cows. *Animal*. 2012; 6(6):920–7. <https://doi.org/10.1017/S1751731111002485> PMID: 22558962
33. Souza V, Almeida R, Silva D, Piekarski P, Jesus C, Pereira M. Effects of partial replacement of soybean meal by protected urea on milk yield and composition. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 2010; 62(6):1415–22.
34. Stewart R, Tricarico J, Harmon D, Chalupa W, McLeod K, Harrison G, et al. Influence of Optigen on nitrogen behavior in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 2008; 91(Suppl 1):491.
35. Tye BM, Yang S-Y, Eun J-S, Young AJ, Hall JO. An investigation of feeding high-moisture corn grain with slow-release urea supplementation on lactational performance, energy partitioning, and ruminal fermentation of dairy cows. *Canadian Journal of Animal Science*. 2017; 97(4):742–52.
36. Varga G, Ishler V. Effect of optigen on milk production, N balance and diet cost in high producing cows. In Scientific poster presented at the 25th Alltech Symposium, Lexington, USA, 17–20 May; Alltech Inc: Nicholasville, KY, USA. 2009.
37. Vellinga TV, Blonk H, Marinussen M, Van Zeist W, Starmans D. Methodology used in feedprint: a tool quantifying greenhouse gas emissions of feed production and utilization. Wageningen UR Livestock Research, Wageningen, The Netherlands., 2013 1570–8616.



38. Kebreab E, Strathe A, Dijkstra J, Mills JA, Reynolds CK, Crompton LA, et al., editors. Energy and protein interactions and their effect on nitrogen excretion in dairy cows. Symposium on Energy and Protein Metabolism and Nutrition, Parma, Italy; 2010.
39. Tomlinson A, Powers W, Van Horn H, Nordstedt R, Wilcox C. Dietary protein effects on nitrogen excretion and manure characteristics of lactating cows. *Transactions of the ASAE*. 1996; 39(4):1441–8.
40. Weiss WP, Willett L, St-Pierre N, Borger D, McKelvey T, Wyatt D. Varying forage type, metabolizable protein concentration, and carbohydrate source affects manure excretion, manure ammonia, and nitrogen metabolism of dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 2009; 92(11):5607–19. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2248> PMID: 19841221
41. Münnich M, Khiaosa-Ard R, Klevenhusen F, Hilpold A, Khol-Parisini A, Zebeli Q. A meta-analysis of feeding sugar beet pulp in dairy cows: effects on feed intake, ruminal fermentation, performance, and net food production. *Animal Feed Science and Technology*. 2017; 224:78–89.
42. Wagner J, Davis N. A Meta-Analysis Evaluation of Feeding MGA® to Feedlot Heifers Implanted with TBA. Proceedings, American Society of Animal Science Western Section. 2007; 58:3–6.
43. Begg CB, Mazumdar M. Operating characteristics of a rank correlation test for publication bias. *Biometrics*. 1994;1088–101. PMID: 7786990
44. Schwab C, Huhtanen P, Hunt C, Hvelplund T. Nitrogen requirements of cattle. *Nitrogen and Phosphorus Nutrition of Cattle and Environment*: CAB International, Wallingford, UK; 2005. p. 13–70.
45. Poppy G, Rabiee A, Lean I, Sanchez W, Dorton K, Morley P. A meta-analysis of the effects of feeding yeast culture produced by anaerobic fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* on milk production of lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 2012; 95(10):6027–41. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5577> PMID: 22921623
46. Eugène M, Massé D, Chiquette J, Benchaar C. Meta-analysis on the effects of lipid supplementation on methane production in lactating dairy cows. *Canadian Journal of Animal Science*. 2008; 88(2):331–7.
47. Huhtanen P, Hristov AN. A meta-analysis of the effects of dietary protein concentration and degradability on milk protein yield and milk N efficiency in dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 2009; 92(7):3222–32. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1352> PMID: 19528599
48. Lawrence D, O'Donovan M, Boland T, Lewis E, Kennedy E. The effect of concentrate feeding amount and feeding strategy on milk production, dry matter intake, and energy partitioning of autumn-calving Holstein-Friesian cows. *Journal of Dairy Science*. 2015; 98(1):338–48. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-7905> PMID: 25465538
49. McNamara S, O'Mara F, Rath M, Murphy J. Effects of different transition diets on dry matter intake, milk production, and milk composition in dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 2003; 86(7):2397–408. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73834-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73834-X) PMID: 12906058
50. Connor E. Invited review: Improving feed efficiency in dairy production: challenges and possibilities. *Animal*. 2015; 9(3):395–408. <https://doi.org/10.1017/S1751731114002997> PMID: 25482927
51. Coleman J, Berry D, Pierce K, Brennan A, Horan B. Dry matter intake and feed efficiency profiles of 3 genotypes of Holstein-Friesian within pasture-based systems of milk production. *Journal of Dairy Science*. 2010; 93(9):4318–31. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2686> PMID: 20723705
52. Waghorn G, Hegarty R. Lowering ruminant methane emissions through improved feed conversion efficiency. *Animal Feed Science and Technology*. 2011; 166:291–301.
53. Yan X, Yan B, Ren Q, Dou J, Wang W, Zhang J, et al. Effect of slow-release urea on the composition of ruminal bacteria and fungi communities in yak. *Animal feed science and technology*. 2018; 244:18–27.
54. Li Z, Mu C, Xu Y, Shen J, Zhu W. Changes in the Solid-, Liquid-, and Epithelium-Associated Bacterial Communities in the Rumen of Hu Lambs in Response to Dietary Urea Supplementation. *Frontiers in Microbiology*. 2020; 11:244. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00244> PMID: 32153533
55. Waghorn G, Dewhurst R. Feed efficiency in cattle the contribution of rumen function. Meeting the challenges for pasture-based dairying Victoria: Proceedings of the 3rd Dairy Science Symposium. 2007;111:23.
56. Foskolos A, Moorby JM. Evaluating lifetime nitrogen use efficiency of dairy cattle: A modelling approach. *PLOS ONE*. 2018; 13(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201638> PMID: 30071098
57. Hristov AN, Bannink A, Crompton LA, Huhtanen P, Kreuzer M, McGee M, et al. Invited review: Nitrogen in ruminant nutrition: A review of measurement techniques. *Journal of Dairy Science*. 2019; 102(7):5811–52. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15829> PMID: 31030912
58. Powell J, MacLeod M, Vellinga TV, Opio C, Falcucci A, Tempio G, et al. Feed–milk–manure nitrogen relationships in global dairy production systems. *Livestock Science*. 2013; 152(2–3):261–72.
59. Whelan S, Mulligan F, Pierce K. Nitrogen efficiency in contrasting dairy production systems. *Advances in Animal Biosciences*. 2013; 4(s1):9–14.

60. Salami S, Luciano G, O'Grady M, Biondi L, Newbold C, Kerry J, et al Sustainability of feeding plant by-products: A review of the implications for ruminant meat production. *Animal Feed Science and Technology*. 2019; 251:37–55.
61. Hristov AN, Oh J, Firkins J, Dijkstra J, Kebreab E, Waghorn G, et al. Special topics—Mitigation of methane and nitrous oxide emissions from animal operations: I. A review of enteric methane mitigation options. *Journal of Animal Science*. 2013; 91(11):5045–69. <https://doi.org/10.2527/jas.2013-6583> PMID: [24045497](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24045497/)
62. Alipour D, Saleem AM, Sanderson H, Brand T, Santos LV, Mahmoudi-Abyane M, et al. Effect of combinations of feed-grade urea and slow-release urea in a finishing beef diet on fermentation in an artificial rumen system. *Translational Animal Science*. 2020; 4(2):839–847.
63. Rebelo LR, Luna IC, Messana JD, Araujo RC, Simioni TA, Granja-Salcedo YT, et al. Effect of replacing soybean meal with urea or encapsulated nitrate with or without elemental sulfur on nitrogen digestion and methane emissions in feedlot cattle. *Animal Feed Science and Technology*. 2019; 257:114293.