

Produção de metano entérico estimado a partir dos ácidos graxos voláteis do fluido ruminal de vacas leiteiras suplementadas com *Lithothamnium Calcareum*

Estimated enteric methane production from volatile fatty acids in the ruminal fluid of dairy cows supplemented with Lithothamnium Calcareum

Magna Fabrícia Brasil Savela *^(ORCID 0000-0003-0886-2054), Uriel Secco Londero ^(ORCID 0000-0001-5595-1223), Laura Valadão Vieira ^(ORCID 0000-0003-4079-8128), Francisco Augusto Burkert Del Pino ^(ORCID 0000-0002-5142-5215), Marcio Nunes Corrêa ^(ORCID 0000-0003-0855-2750)

Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil. *Autor para correspondência: fabibrasil93@gmail.com

Submissão: 10/01/2024 | Aceite: 01/09/2024

RESUMO

O objetivo do estudo foi estimar a produção de metano (CH₄) a partir das proporções de ácidos graxos voláteis (AGV) no fluido ruminal e determinar a sua relação com o consumo de matéria seca (CMS) em vacas leiteiras suplementadas com *Lithothamnium calcareum*. Seis vacas lactantes múltiparas da raça Holandesa, foram distribuídas em dois grupos experimentais, grupo controle (CON; n=3) suplementada com 1,1% de MS de bicarbonato de sódio; e grupo *Lithothamnium calcareum* (LITHO; n=3), com 0,5% da MS de *Lithothamnium calcareum*. Coletas de líquido ruminal foram realizadas uma vez por semana para avaliação de pH e AGV. Diariamente foram registrados o CMS dos animais. A produção de CH₄ foi estimada através de equações baseadas nas proporções de AGV ruminais. Não houve diferença entre o CMS (kg/dia), concentrações de AGV e relação acetato/propionato entre os grupos ($P>0,05$). O rendimento de metano (g CH₄/kg CMS) não teve diferença ($P>0,05$) entre os grupos nos modelos de equação testados. Não houve uma correlação satisfatória entre o CMS e o rendimento de CH₄ para animais do o grupo LITHO e CON. *Lithothamnium calcareum* como aditivo alimentar não foi capaz de reduzir a produção de CH₄, estimada a partir equações baseadas nas proporções de AGV ruminais.

PALAVRAS-CHAVE: Gás de efeito estufa; mitigação de metano; algas marinhas; ruminantes.

ABSTRACT

The aim of this study was to estimate methane (CH₄) production from the proportions of volatile fatty acids (VFA) in ruminal fluid and to determine its relationship with dry matter intake (DMI) in dairy cows supplemented with *Lithothamnium calcareum*. Six multiparous lactating Holstein cows were divided into two experimental groups: control group (CON; n=3) supplemented with 1.1% DM of sodium bicarbonate; and *Lithothamnium calcareum* group (LITHO; n=3) supplemented with 0.5% DM of *Lithothamnium calcareum*. Ruminal fluid was collected once a week to evaluate pH and VFA. DMI of the animals was recorded daily. CH₄ production was estimated using equations based on ruminal VFA proportions. There was no difference in DMI (kg/day), VFA concentrations and acetate/propionate ratio between the groups ($P>0.05$). The methane yield (g CH₄/kg DMI) did not differ ($P>0.05$) between the groups in the equation models tested. There was no satisfactory correlation between DMI and CH₄ yield for animals in the LITHO and CON groups. *Lithothamnium calcareum* as a feed additive was not able to reduce CH₄ production, estimated from equations based on ruminal VFA proportions.

KEYWORDS: Greenhouse gas; methane mitigation; seaweed; ruminants.

A atividade pecuária tem entrado no foco das discussões ambientais nos últimos anos, devido ao desmatamento de áreas de floresta para implantação de pastagens, e por ser responsável direto pelas emissões de gases do efeito estufa (GEE), dióxido de carbono (CO₂) e metano (CH₄) (SIMANUNGKALIT et al. 2023). A maior contribuição do setor pecuário provém dos sistemas de produção de bovinos e ovinos que são responsáveis por até 18% do total das emissões globais dos GEE principalmente na forma de metano

Rev. Ciênc. Agrovet., Lages, SC, Brasil (ISSN 2238-1171) 776

entérico e da decomposição do esterco (KINLEY et al. 2020).

O metano entérico é um subproduto natural da fermentação de nutrientes no ambiente ruminal, sua produção, além de causar impactos ambientais também significa perda da eficiência energética da dieta, afetando diretamente a produtividade animal, representando até 11% da energia bruta dietética consumida pelos ruminantes (ROQUE et al. 2019).

A manipulação da dieta é considerada a estratégia mais direta e eficaz para reduzir as emissões de CH₄ dos sistemas de produção de ruminantes (MAIA et al. 2016). Entre elas, o uso de aditivos alimentares e a suplementação com alto teor de concentrado se apresentam eficazes na redução de CH₄ (EUGÉNE et al. 2011). Avanços recentes em aditivos alimentares com potencial para mitigar as emissões de metano entérico direta ou indiretamente inibindo as arqueas metanogênicas vem sendo pesquisados, entre elas, a suplementação com algas marinhas vermelhas vem tendo resultados satisfatórios devido aos seus compostos halogenados conhecidos por inibir a metanogênese dependente de cobamida (KINLEY et al. 2020). *Lithothamnium calcareum* é uma alga marinha vermelha muito utilizada na alimentação de ruminantes como tamponante do pH ruminal (NEVILLE et al. 2022). No entanto, nenhum estudo observando os efeitos de *Lithothamnium calcareum* como aditivo antimetanogênico foi realizado.

As emissões de CH₄ dos bovinos são difíceis de medir, dependem de equipamentos caros e pessoas qualificadas, sendo impraticável para uso rotineiro em larga escala em fazendas leiteiras (HAMMOND et al. 2015). Dessa forma, algumas alternativas têm sido usadas para prever a produção de CH₄, com o consumo de matéria seca (CMS), perfil de ácidos graxos do leite (CHARMLEY et al. 2016) e proporções de AGV no fluido ruminal (WILLIAMS et al. 2019). Equações modelos baseadas no CMS, composição da dieta, peso corporal, produção e composição do leite foram usados por NIU et al. (2018) para prever a produção de metano (g/dia) em vacas leiteiras, e WILLIAMS et al. (2019) apresentou equações para prever a produção de metano em vacas leiteiras a partir das proporções dos AGV no fluido ruminal incluindo acetato, propionato e butirato.

Diante do exposto, o objetivo do presente estudo foi estimar a produção de metano de vacas leiteiras da raça Holandês suplementadas com *Lithothamnium calcareum* como um ingrediente alimentar antimetanogênico em comparação ao bicarbonato de sódio em uma dieta rica em amido, previsto a partir das proporções de AGV no fluido ruminal e determinar a relação da produção de CH₄ com o CMS.

Para realização desse estudo foram utilizadas seis vacas Holandesas múltiparas em lactação, com $63,74 \pm 18,63$ dias em lactação (DEL), pesando 694 ± 20 kg (SE), com paridade média de $3 \pm 0,59$ lactação, e média de produção de leite pré-experimental $38,83 \pm 9,29$ kg/dia foram usadas no estudo. As vacas foram mantidas em uma propriedade leiteira comercial na cidade de Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brasil, e mantidas em um galpão de sistema de *compost barn* com cama de maravalha e casca de arroz com acesso a comedouros automatizados e individuais e água a vontade. O protocolo de estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas, registrado sob o código 13784-2021.

As vacas foram distribuídas aleatoriamente em dois grupos: Controle (CON) e *Lithothamnium calcareum* (LITHO), ambos compostos por três animais, durante um período experimental de 56 dias, sendo os grupos manejados conjuntamente durante o período experimental. Ambos os tratamentos receberam a mesma dieta basal como ração total misturada (TMR) com uma relação concentrado:volumoso de 54:46% e 29,28% de amido na TMR, as diferenças entre os grupos foram atribuídas à inclusão de 0,5% da MS da dieta de *Lithothamnium calcareum* para o grupo LITHO e para o grupo CON incluído 1,1% da MS da dieta de bicarbonato de sódio, conforme indicação do nutricionista da fazenda, que foram previamente misturados no cocho à TMR imediatamente antes da oferta.

Diariamente foram obtidos os dados de CMS por meio de comedouros automáticos e individuais. Para verificar a correlação entre o CMS com os demais parâmetros, foi realizada uma média semanal de CMS, na qual foram consideradas semanas aquelas que apresentassem no mínimo cinco dias de consumo registrados.

Amostras de líquido ruminal foram coletados por ruminocentese 4h após a alimentação matinal no dia 0, antes da suplementação com a alga e bicarbonato de sódio, e após administração nos dias 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49 e 56 do experimento. O pH do líquido ruminal foi imediatamente medido usando um Phmetro de bancada. Amostras do fluido ruminal foram armazenadas a -80 °C e, posteriormente, utilizadas para determinar as concentrações de AGV (acetato, propionato e butirato total), sendo quantificada pela técnica de ressonância magnética nuclear de hidrogênio segundo WANG et al. (2021).

Para quantificar o rendimento de metano (RM, g CH₄/kg de CMS) foram utilizadas equações

validadas por WILLIAMS et al. (2019), utilizando dados independentes publicados de bovinos leiteiros e de corte consumindo uma ampla variedade de dietas, que podem ser usadas em pesquisas para estimar a produção de metano a partir de dados de AGV. As seguintes equações propostas por WILLIAMS et al. (2019) foram utilizadas:

$$RM = 4,08 \times (\text{acetato} / \text{propionato}) + 7,05 \quad \text{Equação 1}$$

$$RM = 3,28 \times (\text{acetato} + \text{butirato}) / \text{propionato} + 7,6 \quad \text{Equação 2}$$

$$RM = 316 / \text{propionato} + 4,4 \quad \text{Equação 3}$$

Onde a equação 1 é baseada em uma associação comumente observada entre produção de metano e a proporção (acetato/propionato). A equação 2 é baseada em uma associação comumente observada entre a produção de metano e (acetato + butirato)/propionato e a equação 3 é uma simplificação das equações 1 e 2 (WILLIAMS et al. 2019).

Os resultados foram analisados usando o programa JMP® Pro 14 (SAS Institute inc. 2018-2024) por meio do PROC MIXED, para CMS, AGV (acetato, propionato e butirato), ralação acetato/propionato e rendimento de CH₄, tendo como efeitos fixos o grupo, a coleta e suas interações e o animal como efeito aleatório. Os dados coletados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e quando o teste de “F” foi significativo, as médias de tratamento foram comparadas pelo teste de Tukey (P<0,05). As estruturas de covariância (Residual, Unequal Variances, Unstructured, AR(1), Antedependent Equal Variances, Antedependent) foram testadas e os componentes de variância foi a que apresentou o menor valor no critério de informação Bayesiano, sendo está utilizada para as análises de medidas repetidas. A correlação entre o rendimento de CH₄ e o CMS e as proporções de acetato, propionato e butirato e o CMS foram analisados no programa JMP® Pro 14, utilizando a Correlação de Pearson. Caso haja correlação satisfatória (acima de 0,84) e significativa (p< 0,05) será realizado a regressão linear simples.

A inclusão de *Lithothamnium calcareum* na TMR de vacas leiteiras neste estudo não teve efeito (P = 0,15) sobre CMS durante o período de tratamento. Também não teve diferença no CMS na média semanal (P = 0,31), pH ruminal (P=0,57), concentrações totais de acetato, propionato e butirato (P=0,88; P=0,65 e p=0,62, respectivamente), bem como, a relação A/P não foram significativamente diferentes entre as dietas LITHO e CON (2,64 e 2,59 respectivamente, P = 0,77), conforme descritos na Tabela 1.

Tabela 1. CMS, pH ruminal e AGV individual (acético, propiônico, butírico; mol/100 mol de AGV) de vacas holandesas alimentadas com dietas suplementadas com bicarbonato de sódio (CON) ou *Lithothamnium calcareum* (LITHO).

Table 1. DMI, ruminal pH and individual VFA (acetic, propionic, butyric; mol/100 mol VFA) of Holstein cows fed diets supplemented with sodium bicarbonate (CON) or *Lithothamnium calcareum* (LITHO).

Parâmetros	Grupo ¹ média±EPM ²		Valor de P
	CON	LITHO	
CMS/kg/dia	24,43±1,47	25,89 ± 1,47	0,15
CMS/kg/semana	25,63±0,68	26,61 ± 0,66	0,31
pH ruminal	6,79±0,11	6,71±0,11	0,57
Acetato	60,62±1,42	60,33±1,42	0,88
Propionato	24,11±0,74	23,62±0,74	0,65
Butirato	15,14±0,84	15,92±0,84	0,52
Acetato/Propionato (Mm)	2,59±0,12	2,64±0,12	0,77

¹Grupo: CON = Bicarbonato de sódio; LITHO = *Lithothamnium calcareum*. ²Média ± erro padrão da média (EPM).

O rendimento de metano (g CH₄/kg CMS) não teve diferença entre os grupos nos três modelos de equação testados (Eq. 1 (P = 0,77), Eq. 2 (P = 0,60), Eq. 3 (P = 0,61)), demonstrando um desempenho semelhante entre os grupos, conforme demonstrado na Tabela 2.

Os resultados da Tabela 3 demonstram que o rendimento de CH₄ não teve uma correlação positiva satisfatória (acima de 0,84) com o CMS semanal em todos os modelos de equação testados (Eq.1: r 0,47), (Eq.2: r 0,49) e (Eq.3: r 0,49) para o grupo LITHO, embora o valor de P tenha sido significativo (P< 0,05), e não houve significância entre o rendimento de CH₄ e o CMS semanal no grupo CON. Também não houve uma correlação positiva satisfatória entre o CMS semanal com as proporções de acetato (r 0,40, p<0,05) e uma correlação negativa satisfatória com as proporções de propionato (r -0,47, p<0,05) no grupo LITHO (Tabela 4).

Tabela 2. Rendimento de CH₄ (RM) de vacas holandesas alimentadas com dietas suplementadas com bicarbonato de sódio (CON) ou *Lithothamnium calcareum* (LITHO).

Table 2. CH₄ yield of Holstein cows fed diets supplemented with sodium bicarbonate (CON) or *Lithothamnium calcareum* (LITHO).

Parâmetros	Grupo ¹ médio±EPM ²		Valor de P
	CON	LITHO	Grupo
CH ₄ 1 (g de CH ₄ /kg MS) ³	17,64±0,50	17,85±0,50	0,77
CH ₄ 2 (g de CH ₄ /kg MS) ⁴	18,19±0,40	18,49±0,40	0,60
CH ₄ 3 (g de CH ₄ /kg MS) ⁵	17,78±0,38	18,06±0,38	0,61

¹Grupo: CON = Bicarbonato de sódio; LITHO = *Lithothamnium calcareum*. ²Média ± erro padrão da média (EPM); ³RM = 4,08 × (acetato / propionato) + 7,05; ⁴RM = 3,28 × (acetato + butirato) / propionato + 7,6; ⁵RM = 316 / propionato + 4,4.

Tabela 3. Correlação entre o CMS semanal e o rendimento de CH₄ (RM) de vacas holandesas alimentadas com dietas suplementadas com bicarbonato de sódio (CON) ou *Lithothamnium calcareum* (LITHO).

Table 3. Correlation between weekly DMI and CH₄ yield of Holstein cows fed diets supplemented with sodium bicarbonate (CON) or *Lithothamnium calcareum* (LITHO).

	Grupo CON ¹		
	Valor de r	Valor de R ²	Valor de P
CMS (semanal) x CH ₄ 1 ²	-0,11	0,01	0,58
CMS (semanal) x CH ₄ 2 ³	-0,12	0,01	0,53
CMS (semanal) x CH ₄ 3 ⁴	-0,12	0,01	0,55
	Grupo LITHO ¹		
	Valor de r	Valor de R ²	Valor de P
CMS (semanal) x CH ₄ 1 ²	0,47	0,22	0,01
CMS (semanal) x CH ₄ 2 ³	0,49	0,24	<0,01
CMS (semanal) x CH ₄ 3 ⁴	0,49	0,23	<0,01

¹Grupo: CON = Bicarbonato de sódio; LITHO = *Lithothamnium calcareum*. ²RM = 4,08 × (acetato / propionato) + 7,05; ³RM = 3,28 × (acetato + butirato) / propionato + 7,6; ⁴RM = 316 / propionato + 4,4.

Tabela 4. Correlação entre as proporções de acetato, propionato e butirato com o CMS semanal (s) de vacas holandesas alimentadas com dietas suplementadas com bicarbonato de sódio (CON) ou *Lithothamnium calcareum* (LITHO).

Table 4. Correlation between acetate, propionate and butyrate proportions with weekly DMI(s) of Holstein cows fed diets supplemented with sodium bicarbonate (CON) or *Lithothamnium calcareum* (LITHO).

	Grupo CON ¹		
	Valor de r	Valor de R ²	Valor de P
Acético x CMS (semanal)	-0,12	0,01	0,54
Propionico x CMS (semanal)	0,09	0,01	0,65
Butírico x CMS (semanal)	0,10	0,01	0,60
	Grupo LITHO ¹		
	Valor de r	Valor de R ²	Valor de P
Acético x CMS (semanal)	0,40	0,16	0,03
Propionico x CMS (semanal)	-0,47	0,22	0,01
Butírico x CMS (semanal)	-0,28	0,08	0,14

¹Grupo: CON = Bicarbonato de sódio; LITHO = *Lithothamnium calcareum*.

A suplementação de algas vermelhas e de dietas ricas em amido rapidamente fermentáveis, favorecem a produção de propionato, devido ao desvio de hidrogênio para formação de propionato, resultando em menos hidrogênio disponível para metanogênese, portanto, a relação A/P no rúmen influencia na produção de CH₄ (MORGAVI et al. 2010, KINLEY et al. 2020), sendo essas dietas ricas em concentrado métodos eficientes para diminuir a produção de metano entérico (EUGÈNE et al. 2011).

SAUVANT & GIGER-REVERDIN (2009) observaram uma diminuição na produção de CH₄ quando a proporção de concentrado foi >40% do consumo de MS e EUGÉNE et al. (2011) observou diminuição das emissões entéricas de CH₄ em touros confinados suplementados com lipídeos extrusados de linhaça combinados com amido na dieta.

Estudos *in vitro* demonstraram uma redução de 99% de CH₄, diminuição do acetato e uma maior concentração de propionato com a suplementação da alga vermelha *Asparagopsis taxiformis* incluída a 2% da matéria orgânica da dieta (MACHADO et al. 2016) e estudos *in vivo* observaram diminuição da produção de CH₄ em vacas leiteiras em 26,4% e 67,2% com a suplementação de 0,5% e 1% da matéria orgânica de *Asparagopsis armata*, respectivamente (ROQUE et al. 2019). No entanto, até onde se sabe, os efeitos da alga vermelha *Lithothamnium calcareum* sobre a produção de CH₄ foram pouco testados em vacas leiteiras recebendo dietas ricas em amido.

A produção de CH₄ de vacas leiteiras pode ser prevista a partir das proporções de AGV no rúmen utilizando modelos de equações, sendo uma abordagem barata e prática de estimar as emissões de metano (NIU et al. 2018). No presente estudo, o rendimento de CH₄ previsto, não diferiu entre os tratamentos nos três modelos de equações testados. No entanto, a produção de CH₄ prevista, em ambos os grupos foi consistente com os mensurados por métodos tradicionais utilizados para medir a produção de CH₄, (WILLIAMS et al. 2019), ou seja, os parâmetros de AGV no fluido ruminal combinados com CMS medido ou estimado, oferecem uma ferramenta potencial para prever a produção de CH₄ em ruminantes.

A falta de diferença na produção de CH₄ entre as dietas LITHO e CON é consistente com a concentração do perfil de AGV, bem como, com a relação A/P que foram semelhantes entre os grupos, provavelmente não alterando a produção líquida de H₂, que é aumentada com a produção de acetato durante a fermentação ruminal, favorecendo a metanogênese, já a formação de propionato é uma via competitiva de utilização de H₂ no rúmen, reduzindo a disponibilidade de H₂ para a metanogênese (CAREGA & DANTAS 2017). Dessa forma, a produção de CH₄ é influenciada pelas taxas de produção de acetato e propionato ruminal (KINLEY et al. 2020).

Assim como, a suplementação com *Lithothamnium calcareum* não influenciou o CMS durante os 56 dias de experimento bem como, a produção de AGV e o rendimento de CH₄, também não houve uma correlação satisfatória entre o rendimento de CH₄ com o CMS e as proporções de acetato, propionato e butirato, discordando de WILLIAMS et al. (2019) que demonstrou no seu estudo que o rendimento de metano foi positivamente relacionado linearmente com as proporções de acetato e butirato, e o recíproco de propionato.

Na maioria dos estudos que avaliaram os efeitos de algas vermelhas na mensuração de metano, a produção de CH₄ foi reduzido, sendo relacionado com o aumento na produção de propionato ruminal e uma diminuição benéfica na relação A/P (MACHADO et al. 2016). KINLEY et al. (2020) demonstraram que uma inclusão de *Asparagopsis taxiformes* na TMR de alto grão em apenas 0,20% da ingestão da matéria orgânica (MO), altera o padrão de fermentação ruminal com diminuição do acetato e o aumento do propionato e pode eliminar fundamentalmente a produção entérica de CH₄ em comparação com a dieta controle em bovinos de corte. ROQUE et al. (2019) em um estudo com vacas leiteiras Holandesas em lactação, usando um TMR contendo algas marinhas a 1% da ingestão, relatou uma redução de CH₄ em 67% e LI et al. (2018) relatou redução de 80% na produção de CH₄ entérico com *Asparagopsis* oferecido a 3% da ingestão MO em ovelhas Merino e uma redução no acetato e aumento do propionato ruminal. Esses autores atribuíram esses resultados ao bromofórmio que é um potente agente antimetanogênico presente nessas algas vermelhas.

Embora *Lithothamnium calcareum* seja uma espécie de alga vermelha, não contém bromofórmio na sua composição, é composto basicamente de carbonato de cálcio e magnésio em uma estrutura polimorfa semelhante ao favo de mel que propicia um aumento da superfície específica de atuação prolongando o período de ação (DIAS 2000, NEVILLE et al. 2019), sendo muito utilizado como agente tamponante do pH ruminal em dietas altamente energéticas assim como o bicarbonato de sódio. No presente estudo, os resultados de pH ruminal demonstram que as dietas LITHO e CON mantiveram o pH em 6,71 e 6,79 respectivamente, favorecendo as bactérias metanogênicas, que são muito sensíveis a alterações no pH necessitando que este esteja o mais próximo da neutralidade (6,0 a 6,5) (BERCHIELLI et al. 2011), sendo assim, mesmo sendo fornecida uma dieta com alto amido, a suplementação com *Lithothamnium calcareum* não reduziu a mitigação de metano, corroborando o estudo de SIMANUNGKALIT et al. (2023) onde o rendimento CH₄ (g/kg de CMS) de novilhos suplementados com *Lithothamnium calcareum* foi superior aos de novilhos do grupo monensina.

Portanto, pode-se concluir que a suplementação de *Lithothamnium calcareum* em dietas com alto amido, não reduziu a produção estimada de CH₄ entérico, em comparação a uma dieta padrão com bicarbonato de sódio, a partir de equações baseadas nas proporções de ácidos graxos voláteis ruminais em vacas Holandesas em lactação, ademais não houve relação do CMS com a produção do gás. No entanto, é necessário que mais estudos sejam realizados para elucidar o efeito de *Lithothamnium calcareum* como um aditivo alimentar antimetanogênico para vacas leiteiras, não enfatizando apenas dietas energéticas, mas também outros tipos de dieta.

REFERÊNCIAS

- BERCHIELLI TT et al. 2011. Nutrição de Ruminantes. Jaboticabal: Funep.
- CAREGA MFCS & DANTAS A. 2017. Metano ruminal e o uso de taninos condensados como estratégia de mitigação. *Nucleus Animalium* 9: 51-64.
- CHARMLEY E et al. 2016. A universal equation to predict methane production of forage-fed cattle in Australia. *Animal Production Science* 56: 169–180.
- DIAS GTM. 2000. Granulados bioclásticos: algas calcárias. *Brazilian Journal of Geophysics* 18: 1-19.
- EUGÈNE M et al. 2011. Dietary linseed and starch supplementation decreases methane production of fattening bulls. *Animal Feed Science and Technology* 166: 330–337.
- HAMMOND KJ et al. 2015. Methane emissions from cattle: Estimates from short-term measurements using a GreenFeed system compared with measurements obtained using respiration chambers or sulphur hexafluoride tracer. *Animal Feed Science and Technology* 203: 41–52.
- JMP®, Version Pro 14. SAS Institute Inc., Cary, NC, 1989–2024.
- KINLEY RD et al. 2020. Mitigating the carbon footprint and improving productivity of ruminant livestock agriculture using a red seaweed. *Journal of Cleaner Production* 259: 120836.
- LI X et al. 2018. *Asparagopsis taxiformis* decreases enteric methane production from sheep. *Anim. Prod. Sci.* 58: 681-688.
- MACHADO L et al. 2016. Dose-response effects of *Asparagopsis taxiformis* and *Oedogonium* sp. on in vitro fermentation and methane production. *Journal of Applied Phycology* 28: 1443-1452.
- MAIA MRG et al. 2016. The potential role of seaweeds in the natural manipulation of rumen fermentation and methane production. *Scientific Reports* 6: 32321.
- MORGAVI D et al. 2010. Microbial ecosystem and methanogenesis in ruminants. *Animal* 4: 1024-1036.
- NEVILLE EW et al. 2022. Effects of calcareous marine algae on milk yield, feed intake, energy balance, mineral status, and inflammatory markers in transition dairy cows. *Journal of Dairy Science* 105: 6616–6627.
- NEVILLE EW et al. 2019. The effect of calcareous marine algae, with or without marine magnesium oxide, and sodium bicarbonate on rumen pH and milk yield in mid lactation dairy cows. *Journal of Dairy Science* 102: 8027-8039.
- NIU M et al. 2018. Prediction of enteric methane production, yield, and intensity in dairy cattle using an intercontinental database. *Global Change Biology* 24: 3368–3389.
- ROQUE BM et al. 2019. Inclusion of *Asparagopsis armata* in lactating dairy cows' diet reduces enteric methane emission by over 50 percent. *Journal of Cleaner Production*. 234: 132-138.
- SAUVANT D & GIGER-REVERDIN S. 2009. Modélisation des interactions digestives et de la production de méthane. *INRAE Productions Animales* 22: 375–384.
- SIMANUNGKALIT G et al. 2023. The effects of antibiotic-free supplementation on the ruminal pH variability and methane emissions of beef cattle under the challenge of subacute ruminal acidosis (SARA). *Research in Veterinary Science*. 160:30-38.
- WANG M et al. 2021. Comparison of HPLC and NMR for quantification of the main volatile fatty acids in rumen digesta. *Scientific Reports* 11: 1-15.
- WILLIAMS SRO et al. 2019. Volatile Fatty Acids in Ruminal Fluid Can Be Used to Predict Methane Yield of Dairy Cows. *Animals* 9: 1006